ZUR ENTWICKLUNG DER SULFIT- UND NITRITREDUKTASE IN ZELLKULTUREN VON CATHARANTHUS ROSEUS (L.)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

ANNETTE KEMENA

aus Werste/Krs. Minden

Bochum 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0004

ZUR ENTWICKLUNG DER SULFIT- UND NITRITREDUKTASE IN ZELLKULTUREN VON CATHARANTHUS ROSEUS (L.)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

ANNETTE KEMENA

aus Werste/Krs. Minden

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. A. Trebst

Koreferent: Prof. Dr. W. Hengstenberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Ergebnisse 4

2.1. Methodik 4

2.1.1. Testsystem für die Sulfitreduktase 5

2.1.1.1. Aktivierung der Sulfitreduktase durch ihr Substrat 5

2.1.1.2. Stimulierung der Sulfitreduktion durch das Cystein-bildende System 10

2.1.1.3. Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems vom pH-Wert, von der Substrat- und Elektronendonor-Konzentration und von der Proteinmenge 17

2.1.2. Lokalisation und Extraktion der Sulfitreduktase 21

2.1.2.1. Lokalisation der Sulfitreduktase-Aktivität 21

2.1.2.2. Extraktion der Sulfitreduktase unter Berücksichtigung der Nitritreduktase- und der OASS-Aktivität 22

2.1.3. Molekulargewichtsbereich der Sulfit- und Nitritreduktase 26

2.1.4. Testsystem für die (P)APS-reduzierende Aktivität 26

2.1.4.1. Reaktionskinetiken und Abhängigkeiten der (P)APS-reduzierenden Aktivität von der Extraktmenge 27

2.1.4.2. Einfluß von Thiolen auf die (P)APS-reduzierende Aktivität 27

2.1.5. Lokalisation der (P)APS-reduzierenden Aktivität 30

2.1.6. Testsystem für die Nitritreduktase 31

2.1.6.1. Nicht-enzymatische Reaktionen mit dem Elektronendonor 31

2.1.6.2. Abhängigkeit der Nitritreduktase-Aktivität vom pH-Wert, von der Substrat- und Elektronendonor-Konzentration und von der Proteinmenge 32

2.1.7. Zusammenfassung des methodischen Teils 35

2.2. In vivo-Experimente 37

2.2.1. Anzucht und Wachstum der Zellkulturen 37

2.2.2. Aktivitätsverlauf der Sulfat-assimilierenden Enzyme in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen 40

2.2.2.1. Aktivitätsverlauf der ATP-Sulfurylase 40

2.2.2.2. Aktivitätsverlauf der Sulfitreduktase, Vergleich mit der (P)APS-reduzierenden Aktivität in S-heterotrophen Kulturen 42

2.2.2.3. Aktivitätsverlauf der OASS 44

2.2.3. Aktivitätsverlauf der Stickstoff-assimilierenden Enzyme in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen 46

2.2.3.1. Aktivitätsverlauf der Nitratreduktase, Nitritreduktase und Glutamin-Synthetase 47

2.2.3.2. Aktivitätsverlauf der NH_4^+-assimilierenden Enzyme Glutamin-Synthetase/GOGAT und Glutamat-Dehydrogenase 49

2.2.4. Vergleich der Muster der enzymatischen Aktivitäten von Sulfit- und Nitritreduktase 51

3. Diskussion 52

3.1. Reduktion des Sulfitschwefels 52

3.1.1. Aktivität der Sulfitreduktase in vitro 53

3.1.2. Biochemische und physiologische Relevanz der Sulfitreduktase 56

3.2. Regulation der assimilatorischen Sulfatreduktion und Verknüpfung mit der Nitratassimilation in Zellkulturen von Catharanthus roseus 62

3.2.1. Regulation der Sulfat-Aktivierung 63

3.2.2. Regulation der Reduktion 64

3.2.3. Regulation der Cystein-Biosynthese 67

3.2.4. Verknüpfung von Sulfat- und Nitratassimilation 69

4. Zusammenfassung 72

5. Material und Methoden 75

6. Literaturhinweise 91

Abkürzungen

ADP	Adenosin-diphosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AS	Aminosäuren
BSA	Rinderserumalbumin
Cys	Cystein
DTE	Dithioerythritol
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
E	Enzym
e	Elektron
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FAD	Flavin-dinukleotid
Fd_{red}	Ferredoxin, reduziert
Fd_{ox}	Ferredoxin, oxidiert
FMN	Flavin-mononukleotid
FNR	Ferredoxin-$NADP^+$-Oxidoreduktase
Gln	Glutamin
Gln-Syn.	Glutamin-Synthetase
GOGAT	Glutamin-2-oxoglutarat-aminotransferase
G6P	Glucose-6-phosphat
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion, reduziert
$GS\text{-}S^-$	Glutathiondisulfid
GS-SG	Glutathion, oxidiert
$GS\text{-}SO_3^-$	S-Sulfoglutathion
Glu	Glutamat
Glu-DH	Glutamat-Dehydrogenase
α-KG	α-Ketoglutarat
MSH	Mercaptoäthanol
MVH	Methylviologen, reduziert
MV_{ox}	Methylviologen, oxidiert
NaAc	Natriumacetat
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
$NADP^+$	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat,oxidiert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat,reduziert
NAR	Nitratreduktase

NIR	Nitritreduktase
OAS	O-acetylserin
OASS	O-acetylserin-Sulfhydrylase
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PP_i	anorganisches Pyrophosphat
RSH	Alkylsulfid
$RS\text{-}S^-$	"gebundenes" Sulfid
$RS\text{-}SO_3^-$	"gebundenes" Sulfit
RS-SR	Dialkyldisulfid
Ser	Serin
SIR	Sulfitreduktase

1. Einleitung

Mikroorganismen und Pflanzen sind in der Lage, ihren Bedarf an Cystein und Methionin bei S-autotrophem Wachstum, d.h. mit Sulfat als einziger Schwefelquelle zu decken. Der hexavalente Schwefel des Sulfats muß dazu zum divalenten Sulfid reduziert werden. Diese vierstufige Reaktionssequenz wird als "assimilatorische Sulfatreduktion" bezeichnet. Der Unterschied zwischen der mikrobiellen und der pflanzlichen Sulfatassimilation besteht hauptsächlich darin, daß in Pflanzen dem bisherigen Erkenntnisstand zufolge keine freien Intermediate (SO_3^{2-}, S^{2-}) auftreten. Die gesamte Reaktionssequenz läßt sich gliedern in:

1. Aktivierung	(I)	SO_4^{2-}	+	ATP	⟶	APS	+	PP_i
	(II)	APS	+	ATP	⟶	PAPS	+	ADP
2. Transfer	(III)	(P)APS	+	RSH	⟶	$RS\text{-}SO_3^-$	+	AMP (PAP)
	(III')	(P)APS			$\xrightarrow{2e}$	SO_3^{2-}	+	AMP (PAP)
3. Reduktion	(IV)	$RS\text{-}SO_3^-$	+	Fd_{red}	$\xrightarrow{6e}$	$RS\text{-}S^-$	+	Fd_{ox}
	(IV')	SO_3^{2-}	+	Fd_{red}	$\xrightarrow{6e}$	S^{2-}	+	Fd_{ox}
4. Cystein-Biosynthese	(V)	$RS\text{-}S^-$	+	OAS	⟶	Cys	+	RSSR
	(VI)	RSSR			$\xrightarrow{2e}$	2 RSH		
	(V')	S^{2-}	+	OAS	⟶	Cys		

Während die Enzyme der Aktivierung und der Cysteinbiosynthese bekannt und zum Teil bereits gut charakterisiert sind, liegen über Transfer und Reduktion in höheren Pflanzen unterschiedliche Befunde vor. Eine Sulfitreduktase (Gl. IV'), die wie das mikrobielle Enzym in einem 6 Elektronen übertragenden Schritt Sulfit zu Sulfid reduziert, wurde mehrfach beschrieben (Tamura 1965, Tamura et al. 1967, Asada et al. 1969, Murphy et al. 1974). Allerdings konnten "freies Sulfit" und "freies Sulfid" als Intermediate der assimilatorischen Sulfatreduktion in höheren Pflanzen nicht nachgewiesen werden (Schwenn 1970, Schmidt und Schwenn 1971). Es stellte sich daher die Frage nach der physiologischen Relevanz der Sulfitreduktase.

Außerdem waren die meisten gereinigten Sulfitreduktasen nicht spezifisch, sondern reduzierten auch eine Reihe anderer Substrate wie Nitrit, Hydroxylamin und Cytochrom c (Hodson und Schiff 1973, Review). Da Sulfitreduktase und Nitritreduktase (ein Enzym der assimilatorischen Nitratreduktion) große funktionelle und strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen (beide sind im Chloroplasten lokalisiert, katalysieren einen 6 Elektronen übertragenden Reduktionsschritt, verwenden Ferredoxin als Elektronendonor und enthalten als prosthetische Gruppe Sirohäm, ein Porphyrinringsystem mit Eisen als Zentralatom; Fromageot et al. 1959, Kawashima und Asahi 1961, Betts und Hewitt 1966, Ramirez et al. 1966, Asada et al. 1969, Murphy et al. 1974, Aparicio et al. 1975, Hucklesby et al. 1976), wurde gelegentlich postuliert, daß es sich hierbei um identische Enzyme handeln könnte. Verschiedene Versuche, Sulfitreduktase und Nitritreduktase zu isolieren und anzureichern, führten je nach verwendeter Extraktions- und Reinigungsmethode zu unterschiedlichen Molekulargewichten, Substrat- und Elektronendonorspezifitäten (Asada et al. 1969, Hucklesby und Hewitt 1970, Hucklesby et al. 1976, Cárdenas et al. 1972, Zumft 1972, Ida et al. 1974, Aparicio et al. 1975, Vega und Kamin 1977, Tamura et al. 1978, Hirasawa und Tamura 1979 und 1980), so daß auf diesem Wege keine eindeutige Aussage darüber möglich war, ob es sich bei der Sulfitreduktion um ein Artefakt der Nitritreduktase handelte.

In Chloroplasten wurden Sulfit und Sulfid als Intermediate der Sulfatassimilation gebunden an ein niedermolekulares Carrierprotein gefunden ($RS\text{-}SO_3^-$, $RS\text{-}S^-$; Schwenn 1970, Schmidt und Schwenn 1971), was zu der Annahme führte, daß eine Thiosulfonatreduktase in vivo den Reduktionsschritt katalysiert (Gl.IV). Diese Enzymaktivität ist mehrfach untersucht worden, wobei die Frage ungeklärt blieb, in welcher Relation Sulfitreduktase und Thiosulfonatreduktase zueinander stehen (Schmidt 1973, Hennies 1974, Schmidt et al. 1974, Schwenn et al. 1976, Schwenn und Trebst 1976). Während Schmidt et al. (1974) für Chlorella zwei nebeneinander existierende Reduktionsprozesse postulieren, einen für gebundenes Sulfit (Thiosulfonatreduktase) und einen zweiten für freies Sulfit, welches in Gegenwart aktiver Thiole

(GSH) entsteht (Sulfitreduktase), diskutieren Schwenn und Trebst (1976) die Möglichkeit, daß die Sulfitreduktase eine Untereinheit eines Enzymkomplexes ist, der in vivo gebundenes Sulfit reduziert.

Ein Enzymkomplex, der von APS ausgehend in Gegenwart von O-acetylserin-Sulfhydrylase und OAS (Gl.V) Cystein bildet, wurde von Urlaub in Membranpartikeln gefunden. Die Einzelaktivitäten (S-Sulfotransferase, Thiosulfonatreduktase, Disulfidreduktase, Sulfitreduktase und FNR) waren erst nach Verlust der Aktivität des APS-reduzierenden Enzymkomplexes nachweisbar (Urlaub und Jankowski 1982, im Druck).

In Mikroorganismen wurde die physiologische Bedeutung von Sulfitreduktase und Nitritreduktase geklärt, indem man unter Berücksichtigung der Prinzipien der Enzymregulation, wonach ein Enzym durch das Endprodukt der betreffenden Biosynthesekette reprimiert wird, den Stickstoff- bzw. Schwefel-Stoffwechsel durch entsprechend veränderte Anzuchtsbedingungen beeinflußte (Kemp et al. 1963, Kemp und Atkinson 1966, Jones-Mortimer 1968, Kredich 1971, Cherest et al. 1973). Unterschiede im Muster der enzymatischen Aktivität ließen dabei Rückschlüsse auf die Beteiligung des untersuchten Enzyms am betreffenden Stoffwechselweg zu. Da in Kultur gezogene pflanzliche Zellen in ähnlicher Weise zu handhaben sind wie Mikroorganismen, sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, durch Austausch des Sulfats im Nährmedium gegen reduzierten Schwefel einer Repression analoge Änderungen der assimilatorischen Sulfatreduktion und eventuell auch der Nitratreduktion herbeizuführen. Es wurde erwartet, mit dieser Methode die Sulfitreduktase gegen die Nitritreduktase abgrenzen und zur Thiosulfonatreduktase bzw. zum APS-reduzierenden Enzymkomplex in Beziehung setzen zu können. Außerdem sollten auf diese Weise sowohl die Regulation der einzelnen an der Sulfat- und Nitratassimilation beteiligten Enzyme als auch eventuelle Verknüpfungen zwischen den beiden funktionell und strukturell sehr ähnlichen Assimilationswegen untersucht werden.

2. Ergebnisse

Analog zu den Prinzipien der Enzymregulation bei Mikroorganismen wird angenommen, daß auch bei den Zellkulturen höherer Pflanzen die Gesamtaktivität eines Enzyms als Maß für eine durch die Bedingungen der Anzucht verursachte "Regulation"* dienen kann. Die "Repression" eines Enzyms ist dann zu erwarten, wenn den Zellen das Endprodukt einer Reaktionsfolge im Nährmedium angeboten wird. Umgekehrt sollte das Substrat eine "Derepression" oder "Induktion" hervorrufen. Methodisch wird hierbei vorausgesetzt, daß das zu untersuchende Enzym in nicht limitiertem, völlig aktivem Zustand gemessen werden kann. Neben einem Testsystem, das optimale Bedingungen für die Aktivitätsmessung schafft, muß auch ein Verfahren zur möglichst vollständigen und gleichzeitig schonenden Extraktion gefunden werden. Hierbei auftretende Schwierigkeiten durch aktivitätsmindernde Einflüsse, hervorgerufen etwa durch phenolische Verbindungen, proteolytische Enzyme oder durch unvollständige Extraktion, lassen sich umgehen, indem die meßbare Enzymaktivität auf den Gehalt an löslichen Proteinen bezogen und als spezifische Aktivität angegeben wird.

2.1. Methodik

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß Sulfit- und Nitritreduktase Ferredoxin als den vermutlich physiologischen Elektronendonor für den 6 Elektronen übertragenden Reduktionsschritt verwenden. Daneben akzeptieren sie aber auch reduziertes Methylviologen, welches das hierzu erforderliche stark negative Redoxpotential besitzt. Die photometrische Messung der Reduktion von Sulfit und Nitrit als Extinktionsabnahme von

* Da die Regulationsvorgänge auf molekularer Ebene nicht untersucht wurden, sollen die Ausdrücke Repression, Derepression, Induktion und Hemmung lediglich das apparente Verhalten von Enzymaktivitäten beschreiben.

Methylviologen bei 604 nm unter anaeroben Bedingungen erwies sich als ein empfindliches System mit einer Nachweisgrenze von 0,1 nMol MV_{ox}/Min. NADPH konnte als Elektronendonor nicht verwendet werden. Die Extinktionsmessungen erfolgten mit partiell gereinigtem Enzymextrakt aus Zellkulturen von Catharanthus roseus.

Die an Partikel gebundene (P)APS-reduzierende Aktivität konnte wegen stark oxidierender Nebenaktivitäten in dem System mit Methylviologen nicht gemessen werden; aus diesem Grunde wurde hier Ferredoxin als Elektronendonor eingesetzt.

2.1.1. Testsystem für die Sulfitreduktase

2.1.1.1. Aktivierung der Sulfitreduktase durch ihr Substrat

Die Sulfitreduktase-Aktivität wurde durch Substratkonzentrationen von über 0,1 mM um 50% reduziert (Abb.1). Diese Substrathemmung trat nicht auf, wenn die Sulfitkonzentration

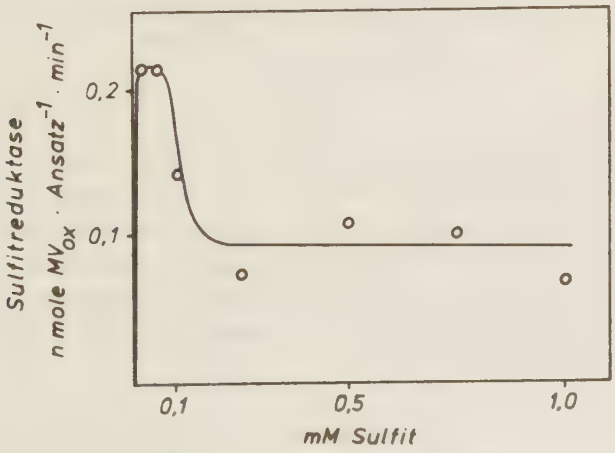


Abb.1: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Substratkonzentration
Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein OAS

durch sequentielle Zugabe steigender Mengen an Sulfit allmählich erhöht wurde. Die hierbei erzielte Endaktivität lag um 100% höher als in einem mit 0,75 mM Sulfit gestarteten Ansatz (Abb.2). Es zeigte sich, daß eine Vorinkubation mit 0,125 mM Sulfit genügte, um nach Reaktionsstart mit 2,5 mM Substrat maximale Endaktivität zu erreichen.

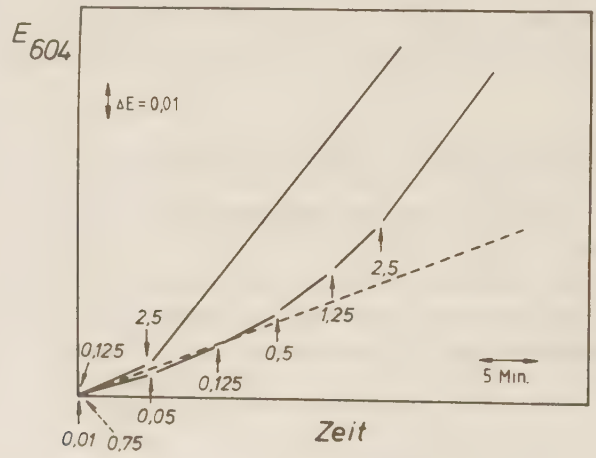


Abb.2: Aktivierung der Sulfitreduktase durch ihr Substrat
Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein OAS; die Substrat-Konzentration wurde durch sequentielle Zugabe steigender Mengen an Sulfit allmählich erhöht; Sulfit-Konzentrationsangaben in mM

Von entscheidender Bedeutung war die Aktivierungsdauer; erst oberhalb von 5 Minuten wurden maximale Endaktivitäten erzielt (Abb.3).

Die zur maximalen Aktivierung erforderliche Konzentration an Sulfit war abhängig von der eingesetzten Proteinmenge (Abb.4 a,b). Bei niedrigen Proteingehalten zeigten höhere Sulfit-Konzentra-

tionen eine hemmende Wirkung, vergleichbar der anfangs beschriebenen Substrathemmung. Bei mittleren Proteinmengen ergab sich eine Abhängigkeit mit einem Optimum im Bereich mittlerer Sulfit-Konzentrationen, und bei hohen Proteingehalten wirkte selbst eine Konzentration von 0,5 mM Sulfit noch nicht hemmend.

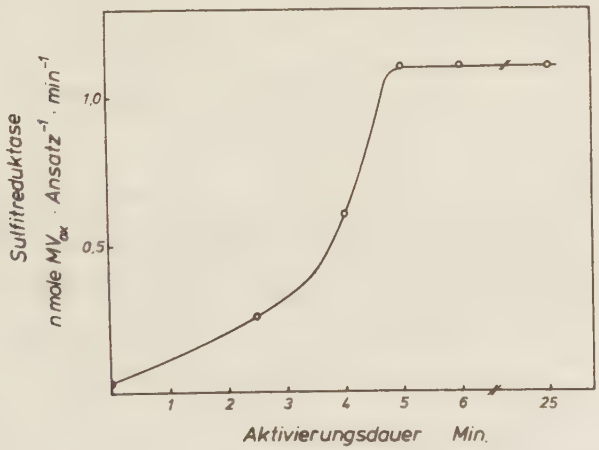


Abb.3: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Aktivierungsdauer
Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein OAS; die Reaktion wurde nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit 125 µM Sulfit durch Zugabe von 2,5 mM Substrat gestartet.

Die Sättigung der Sulfitreduktase mit ihrem Substrat war nach 5minütiger Vorinkubation mit 0,125 mM Sulfit bei etwa 2 mM erreicht (Abb.5).

Sättigung mit dem Elektronendonor lag oberhalb einer Konzentration von etwa 80 µM vor (Abb.6).

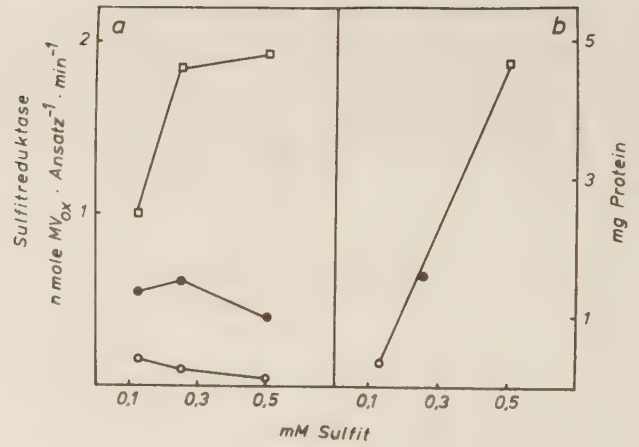


Abb.4 a: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Substrat-Aktivierungskonzentration bei unterschiedlichen Proteingehalten; ○ 0,33 mg; ● 1,6 mg; □ 4,68 mg

b: Abhängigkeit der optimalen Substrat-Aktivierungskonzentration vom Proteingehalt

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein OAS; der Reaktionsstart erfolgte jeweils mit 2,5 mM Substrat

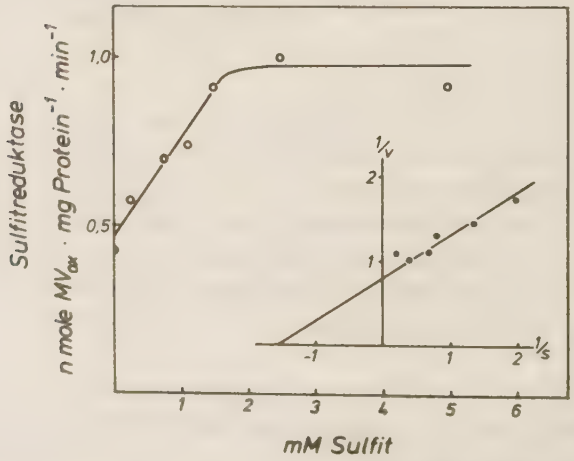


Abb.5: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Substratkonzentration

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein OAS; die Substrat-Aktivierung der Sulfitreduktase erfolgte jeweils mit 125 µM Sulfit

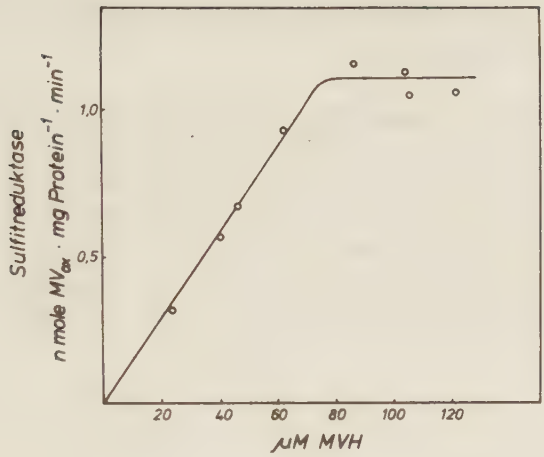


Abb.6: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Elektronendonor-Konzentration

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein OAS; die Aktivierung der SIR erfolgte mit 0,125 mM Sulfit, der Reaktionsstart mit 2,5 mM

Die Stöchiometrie von oxidiertem Methylviologen zu gebildetem Sulfid (colorimetrisch bestimmt nach Siegel 1965, siehe Material und Methoden) lag im Bereich von 5:1 bis 9:1 (Tab.1); die Streuung der Werte war auf Meßungenauigkeiten des colorimetrischen Tests zurückzuführen, dessen Nachweisgrenze bei den vorliegenden Umsätzen erreicht wurde.

Experiment	$\frac{\text{nMole } MV_{ox}}{\text{Min.x mg Prot.}}$	$\frac{\text{nMole } S^{2-}}{\text{Min.x mg Prot.}}$	Stöchiometrie $S^{2-} : MV_{ox}$
1	0,43	0,048	1 : 9
2	0,16	0,027	1 : 6
3	0,11	0,021	1 : 5

Tab.1: Sulfitreduktion: Stöchiometrie von gebildetem Sulfid zu oxidiertem Methylviologen

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein OAS; die Aktivierung der SIR erfolgte mit 0,125 mM Sulfit, der Reaktionsstart mit 2,5 mM

2.1.1.2. Stimulierung der Sulfitreduktion durch das Cystein-bildende System

Die Sulfitreduktase-Aktivität ließ sich durch Ankopplung des Cystein-bildenden Systems (O-acetylserin-Sulfhydrylase und OAS) stimulieren. Abb.7a zeigt die Aktivität der partiell gereinigten Sulfitreduktase in Abhängigkeit von der OAS-Konzentration bei verschiedenen Proteingehalten. Der Kurvenverlauf ist in allen drei Fällen zweiphasig mit einem ersten Sättigungspunkt bei 5 mM OAS und einem zweiten, dessen Lage sich mit der Protein-

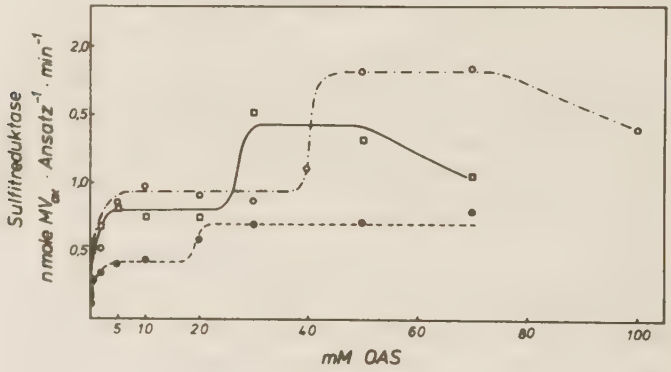


Abb. 7a: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der OAS-Konzentration bei unterschiedlichen Proteingehalten

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

●---● 0,12 mg Protein ○-·-○ 0,35 mg Protein
□——□ 0,27 mg Protein

konzentration änderte. Der erste, den drei Kurven gemeinsame OAS-Sättigungspunkt lag im Bereich des doppelten in der Literatur beschriebenen K_M-Wertes der O-acetylserin-Sulfhydrylase für OAS (K_M= 2,17 mM in Rettichwurzeln, Tamura et al. 1976, K_M= 3,5 mM in Klee, K_M= 3,1 mM in Erbsen, Hock Ng und Anderson 1978). Dies ließ auf eine Beteiligung der OASS an der Steigerung der Sulfitreduktase-Aktivität schließen.

Zwischen Proteingehalt und OAS-Konzentration am 2. Sättigungspunkt wurde eine lineare Beziehung festgestellt (Abb.7b).

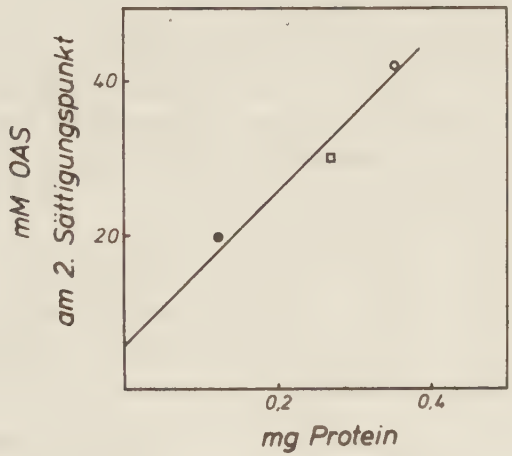


Abb.7b: Abhängigkeit der OAS-Konzentration am 2. Sättigungspunkt vom Proteingehalt

Bei dieser zweiten Phase der Aktivitätssteigerung durch OAS konnte es sich daher nicht um eine Substratsättigung im eigentlichen Sinne handeln; vielmehr wurde aufgrund der Abhängigkeit von der Enzymmenge vermutet, daß das Protein selbst als Substrat diente.

Im Bereich hoher OAS- und Proteinkonzentrationen wurde der Elektronendonor limitierend, was zu einer Abnahme der Sulfitreduktase-Aktivität führte (Abb.7a). Der Grund hierfür lag in einer nicht-enzymatischen Reaktion des OAS mit Methylviologen in Gegenwart von Sulfit, die ab 30 mM OAS auftrat und eine Extinktionsabnahme von E_{604} = 0,0008 x $Min.^{-1}$ x 10 mM OAS^{-1} verursachte. Diese Basalraten wurden bei der Aktivitätsmessung der Sulfitreduktase stets berücksichtigt. Bei großen Proteinmengen, die für maximale Sulfitreduktase-Aktivität hohe OAS-Konzentrationen benötigten, war das Methylviologen aufgrund der beiden um den Reduktanden konkurrierenden Reaktionen nach kurzer Zeit limitierend.

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden durchgeführt, um Aufschluß über die Mechanismen zu erhalten, die dieser OAS-abhängigen Stimulierung der Sulfitreduktion zugrunde lagen.

a) Spezifität für O-acetylserin

Die Stimulierung der Sulfitreduktase-Aktivität war spezifisch für O-acetylserin; durch Serin, Acetat, Acetaldehyd oder Serin und Acetat in Kombination konnte OAS nicht substituiert werden (Tab.2).

Zusatz	Sulfitreduktase-Aktivität nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.
-	1,14
40 mM OAS	11,52
40 mM Ser	1,08
-	1,98
40 mM OAS	6,66
40 mM NaAc	2,34
40 mM Acetaldehyd	1,14
-	3,42
40 mM Ser + 40 mM NaAc	4,74
40 mM OAS	15,90

Tab.2: Spezifität der Stimulierung der Sulfitreduktase für OAS
Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

b) Beteiligung der O-acetylserin-Sulfhydrylase

Die Stimulierung der Sulfitreduktase-Aktivität durch O-acetylserin nahm mit fortschreitender Reinigung kontinuierlich ab (Tab.3). In einer nach Ionenaustauschchromatographie OASS-freien Fraktion besaß O-acetylserin keinen stimulierenden Effekt mehr.

Reinigungsschritt	Sulfitreduktase-Akt. nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.		Stimulierung durch OAS
	- OAS	+ OAS	
Gelchromatographie (Biogel P4)	0,67	13,34	20
Gelchromatographie (Sephacryl S 200)	3,31	39,44	12
Ionenaustausch-Chrom. (Sephacel) 100 mM NaCl	9,98	39,38	4
300 mM NaCl (OASS-frei)	5,12	6,84	∿1

Tab.3: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von OAS bei fortschreitender Reinigung

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

Durch Zugabe von gereinigter O-acetylserin-Sulfhydrylase zu einem OASS-freien Extrakt konnte die OAS-Abhängigkeit wiederhergestellt werden (Tab.4).

Der Vergleich des Aktivitätsverhältnisses zwischen Sulfitreduktase in Abwesenheit von OAS und O-acetylserin-Sulfhydrylase mit dem Verhältnis zwischen Sulfitreduktase-Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von OAS zeigte, daß die Sulfitreduktase oberhalb eines 800- bis 1000-fachen OASS-Aktivitätsüberschusses maximal stimuliert wurde (Abb.8).

Zusatz	Sulfitreduktase-Aktivität nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.
OAS	0,96
OAS + OASS	10,26

Tab.4: Einfluß des Cystein-bildenden Systems auf die über Ionenaustauscher (Sephacel) gereinigte, OASS-freie Sulfitreduktase

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

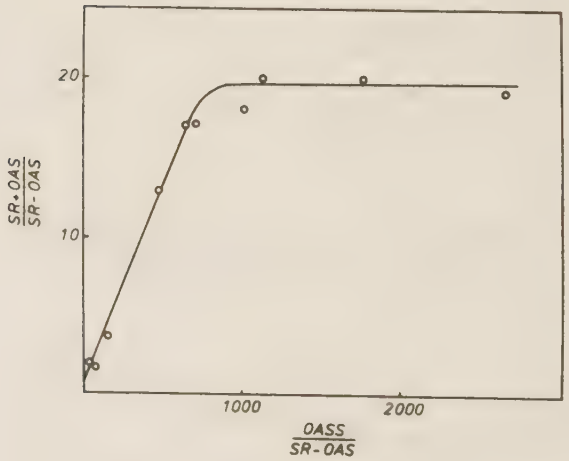


Abb.8: Sättigung der Sulfitreduktion mit dem Cystein-bildenden System

c) Endproduktbestimmung

Bei dem Versuch, das Endprodukt dieser Reaktionskette

$$SO_3^{2-} \xrightarrow[MVH]{} S^{2-} \xrightarrow[OAS]{} \text{Cystein}$$

nachzuweisen, stellte sich heraus, daß Cystein und Sulfid im Verhältnis 0,6:1 bis 1,5:1 entstanden (Tab.5).

Experiment	nMole Endprodukt/Min. x Ansatz		Verhältnis
	Sulfid	Cystein	Sulfid : Cystein
1	0,255	0,410	0,6 : 1
2	0,124	0,136	0,9 : 1
3	0,133	0,120	1,1 : 1
4	0,162	0,105	1,5 : 1

Tab.5: Endprodukte der Sulfitreduktion in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

Eine Überprüfung des Substratumsatzes des Cystein-bildenden Systems ergab, daß der Umsatz des Sulfids nur bei kurzen Inkubationszeiten und niedrigen Proteingehalten vollständig ablief (Tab.6a,b). Wegen der geringen Umsatzraten der Sulfitreduktase (1-2 nMole/Min. x Ansatz) ließen sich die genannten Bedingungen zur Endproduktbestimmung nicht anwenden, da die Nachweisgrenzen der colorimetrischen Tests eingehalten werden mußten. Ein Vergleich des Sulfid/Cystein-Verhältnisses mit der Inkubationszeit ergab eine lineare Abhängigkeit, die bei langer Inkubationsdauer zugunsten des Sulfids ausfiel (Abb.9).

Eine Stöchiometrie von oxidiertem Methylviologen zu gebildetem Endprodukt, die im Bereich des erwarteten Verhältnisses von 6 : 1 lag,ergab sich, wenn beide Endprodukte (Sulfid und Cystein)

a

Ansatz	Inkubationszeit	nMole Sulfid$_{verblieben}$
2 mg Protein 50 nMole S^{2-} eingesetzt	5 Min. 20 Min. 90 Min.	0 2,40 8,65

b

Ansatz	Protein	nMole Sulfid$_{verblieben}$
20 nMole S^{2-} eingesetzt	2 mg	10,10
90 Min. inkubiert	0,5 mg	2,64

Tab.6: Umsatz von Sulfid durch das Cystein-bildende System

a) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
b) in Abhängigkeit vom Proteingehalt

Versuchsdurchführung: Zusammensetzung der Ansätze wie in Material und Methoden beschrieben; Zusatz von Sulfid wie angegeben; die Ansätze wurden nicht anaerobisiert

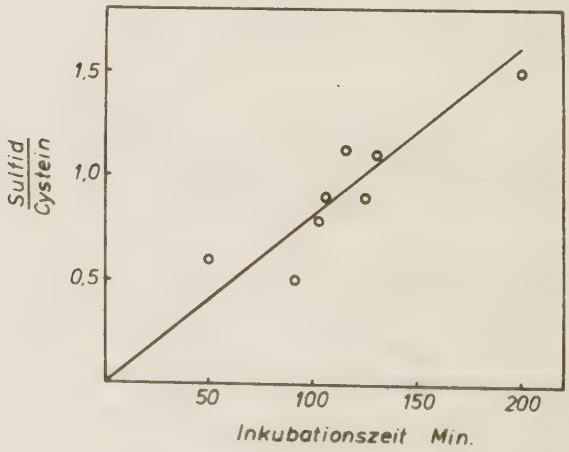


Abb.9: Abhängigkeit des bei der Sulfitreduktion in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems entstandenen Sulfid/Cystein-Verhältnisses von der Inkubationsdauer

addiert wurden. Bei langen Inkubationszeiten verschob sich die Stöchiometrie zugunsten des oxidierten Reduktanden (Tab.7). Der Grund hierfür wird in der mit fortschreitender Inkubationsdauer limitierenden Konzentration an reduziertem Methylviologen gesehen.

Experiment	$\frac{\text{nMole } MV_{ox}}{\text{Min. x mg Prot.}}$	$\frac{\text{nMole } S^{2-} + \text{Cys}}{\text{Min. x mg Prot.}}$	Inkub. Min.	Stöch. S^{2-}+Cys : MV_{ox}
1	4,64	0,21	360	1 : 22
2	3,08	0,29	180	1 : 10
3	2,00	0,15	180	1 : 13
4	1,16	0,19	90	1 : 6
5	2,00	0,42	90	1 : 5

Tab.7: Sulfitreduktion: Stöchiometrie von gebildetem Endprodukt (Cystein + Sulfid) in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems zu oxidiertem Methylviologen

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

2.1.1.3. Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems vom pH-Wert, von der Substrat- und Elektronendonor-Konzentration und von der Proteinmenge

Der für die Sulfitreduktase-Aktivität optimale pH-Bereich lag zwischen 6,8 und 7,8 (Abb.10). Bei niedrigeren Werten wurde eine nicht-enzymatische Oxidation von Methylviologen beobachtet; der Aktivitätsabfall bei höheren Werten ist wahrscheinlich auf eine Umlagerung des O-acetylserins zu N-acetylserin oberhalb von pH 8,0 zurückzuführen.

In Gegenwart des Cystein-bildenden Systems war eine Aktivierung der Sulfitreduktase durch sequentielle Zugabe steigender Substratmengen nicht mehr erforderlich (Abb.11). Bei Zu-

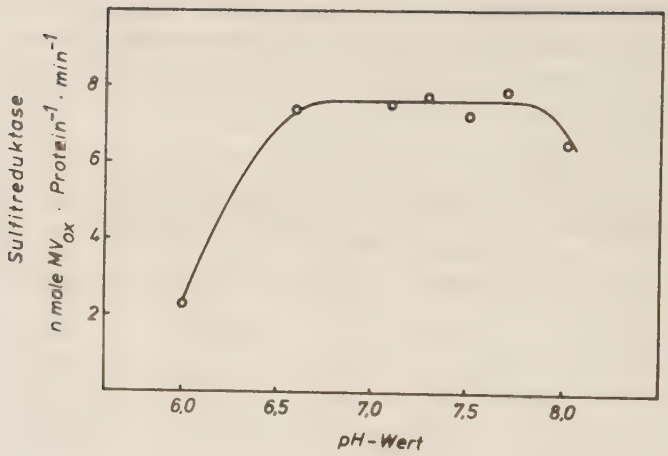


Abb.10: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems vom pH-Wert

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

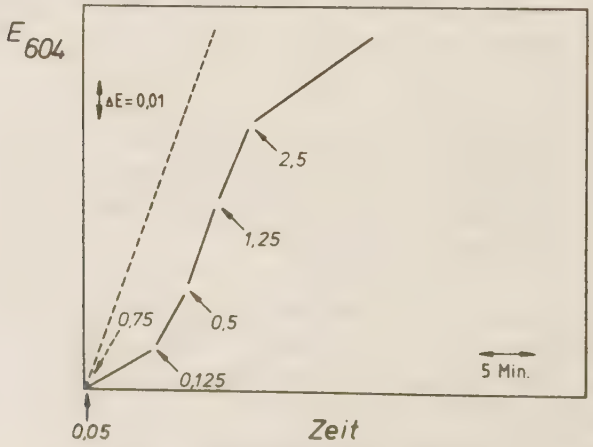


Abb.11: Sulfitreduktase-Aktivität in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems bei sequentieller Zugabe steigender Substratmengen

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden
Sulfit-Konzentrationsangaben in mM

gabe von 2,5 mM Sulfit trat eine Substrathemmung auf.

Die Abhängigkeit von der Substratkonzentration folgte der Michaelis-Menten-Beziehung (Abb.12). Für Sulfit wurde ein apparenter K_M-Wert von 0,25 mM ermittelt.

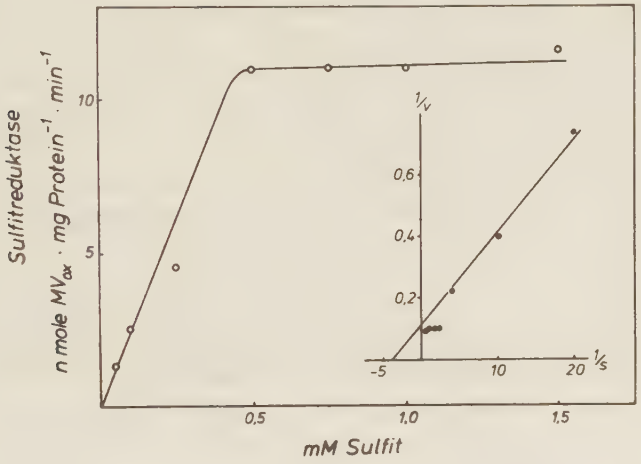


Abb.12: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Substratkonzentration in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

Die Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Elektronendonor-Konzentration in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems zeigt die Abb.13. Sättigung war, wie im System ohne OAS, etwa bei 80 µM reduziertem Methylviologen erreicht.

Eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge war in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems unterhalb von 1 mg Protein gewährleistet (Abb.14). Limitierender Faktor war die OAS-Konzentration (vgl. Ausführungen über hohe OAS-Konzentrationen bei großen Proteinmengen, Kap. 2.1.1.2.)

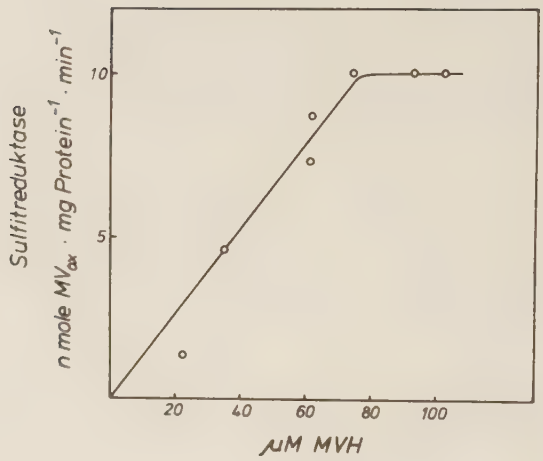


Abb.13: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Elektronendonor-Konzentration in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

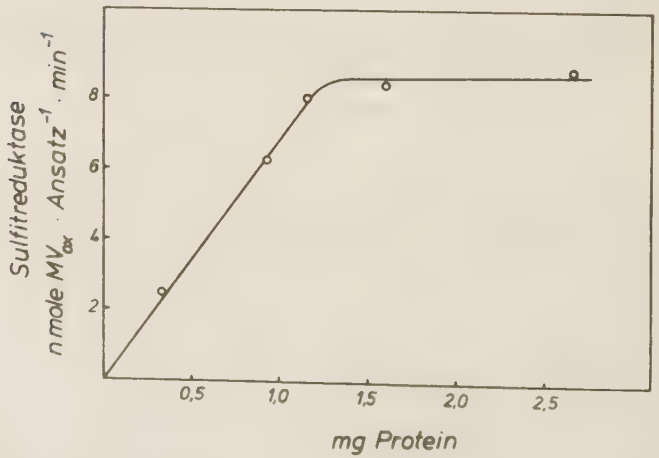


Abb.14: Abhängigkeit der Sulfitreduktase-Aktivität von der Proteinmenge in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

2.1.2. Lokalisation und Extraktion der Sulfitreduktase

2.1.2.1. Lokalisation der Sulfitreduktase-Aktivität

Zur Lokalisation der Sulfitreduktase wurden nach mechanischem Aufbrechen aus dem Zellhomogenat eine lösliche (S_{48}) und eine partikuläre Fraktion (P_{48}) präpariert (siehe Material und Methoden), wobei die partikelgebundenen Enzyme durch Stehenlassen des Homogenats in hypotonischem Puffer im Eisbad in Lösung gebracht werden sollten, da die Partikel im MVH-System wegen stark oxidierender Aktivitäten nicht zu verwenden waren. Den überwiegenden Teil der gemessenen Sulfitreduktase-Aktivität (68%) enthielt die partikuläre Fraktion (Tab.8). Durch die übliche Aufarbeitungsmethode (Aufschluß der Zellen durch Homogenisieren und sofortige Weiterverarbeitung) wurde demnach nur etwa ein Drittel der Sulfitreduktase erfaßt.

Fraktion	Sulfitreduktase-Aktivität nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.
S_{48}	4,68 (32%)
P_{48}	10,02 (68%)

Tab.8: Sulfitreduktase-Aktivität in einer löslichen und einer partikulären Fraktion aus Zellgewebe von Catharanthus

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

2.1.2.2. Extraktion der Sulfitreduktase unter Berücksichtigung der Nitritreduktase- und der OASS-Aktivität

Ein Zellaufschluß durch mechanisches Aufbrechen brachte, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, nur einen Teil der Sulfitreduktase in Lösung. Es wurde daher nach effektiveren Extraktionsmethoden gesucht, wobei die Nitritreduktase und die OASS ebenfalls stets überprüft werden mußten, um eventuelle aktivitätsmindernde Einflüsse auf diese Enzyme zu erkennen (Beschreibung der Testsysteme siehe Kap. 2.1.6. und Material und Methoden).

a) Behandlung mit Ultraschall

Eine Behandlung des mechanisch aufgebrochenen Zellhomogenats mit Ultraschall erbrachte keine Aktivitätszunahme der Sulfitreduktase (Tab.9).

Enzym	Aktivität nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.	
	Homogenat	Sonicat
Sulfitreduktase	12,42	11,52
Nitritreduktase	57,42	57,72

Tab.9: Aktivität der Sulfit- und Nitritreduktase in partiell gereinigtem Enzymextrakt mit und ohne Ultraschallbehandlung

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

b) Einfluß niedriger Ionenstärken

Das Homogenat wurde nach mechanischem Aufschluß über 5 Stunden in hypotonischem Puffer im Eisbad belassen und in bestimmten Zeitintervallen auf Sulfitreduktase-, Nitritreduktase- und O-acetylserin-Sulfhydrylase-Aktivität getestet. Abb.15 zeigt, daß die Sulfitreduktase-Aktivität (gemessen in Gegenwart und in Abwesenheit des Cystein-bildenden Systems) nach einer Stunde um das Zweieinhalbfache ihres Ausgangswertes angestiegen war und

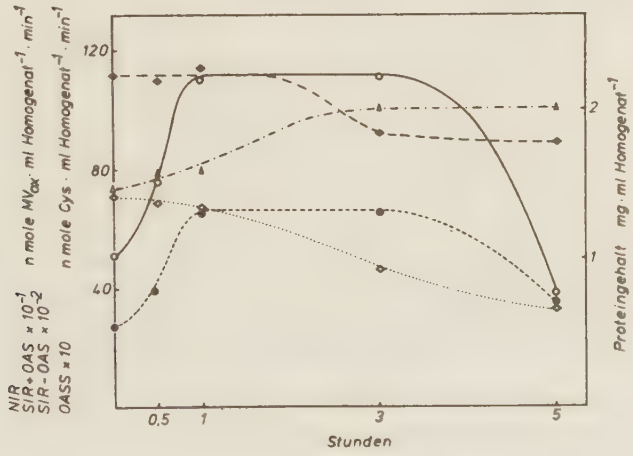


Abb.15: Solubilisieren von mechanisch aufgebrochenem Zellhomogenat in hypotonischem Puffer, Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von Sulfitreduktase (in Gegenwart und Abwesenheit von OAS), Nitritreduktase und OASS nach 0,5, 1, 3 und 5 Stunden

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

◆---◆ NIR ○—○ SIR + OAS Δ-·-·Δ Protein

◇·····◇ OASS ●---● SIR - OAS

dieses Niveau über drei Stunden beibehielt. Niedrige Ionenstärken bewirkten demnach das Herausdiffundieren der Sulfitreduktase

aus Membranpartikeln. Nach fünf Stunden war die Aktivität um 50% wieder abgesunken, was auf einen Aktivitätsverlust hinweist. Der drastischere Aktivitätsabfall in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems läßt sich durch die Tatsache erklären, daß die OASS-Aktivität im Extrakt kontinuierlich abnahm und daher nach 3 Stunden für die Stimulierung der Sulfitreduktion limitierend wurde.

Die Nitritreduktase wurde durch die niedrige Ionenstärke nur geringfügig beeinflußt; nach 3 Stunden lag ihre Aktivität um 2o% unter dem Ausgangswert.

c) Behandlung mit einem Detergenz

Durch die Einwirkung eines Detergenz auf das Zellhomogenat, ein aktiver Vorgang, bei dem Enzyme aus den Partikeln herausgelöst werden können, ließ sich ebenfalls eine Aktivitätssteigerung der Sulfitreduktase erreichen. Dem Homogenisierungspuffer wurden verschiedene Mengen an Triton X-100 zugesetzt und das Homogenat vor einer partiellen Reinigung für 15 Minuten im Eisbad belassen. Die Sulfitreduktase-Aktivität stieg bereits bei einem Tritongehalt von 0,001 v/v auf das Doppelte ihres Ausgangswertes an (Abb.16); höhere Tritonkonzentrationen bis zu 0,01 v/v, die auf die OASS und besonders auf die Nitritreduktase einen stark hemmenden Einfluß ausübten, setzten die Sulfitreduktase-Aktivität nicht herab. In Gegenwart des Cystein-bildenden Systems nahm die Aktivität der Sulfitreduktase etwa parallel mit der O-acetylserin-Sulfhydrylase ab.

Die Nitritreduktase zeigte bei einer sehr niedrigen Tritonkonzentration von 0,001 v/v eine 40%ige Aktivitätssteigerung; ein Gehalt von 0,005 v/v des Detergenz verminderte die Aktivität jedoch bereits um 60%; bei 0,01 v/v wurde sie fast vollständig gehemmt.

Nach Solubilisieren mit 0,001 v/v Triton war etwa die gleiche Sulfitreduktase-Aktivität in der löslichen Fraktion enthalten wie nach dreistündigem Stehenlassen des Homogenats in hypotonischem Puffer, wobei die beiden anderen maßgeblichen Enzyme, Nitritreduktase und OASS, nicht geschädigt wurden. Darüberhinaus

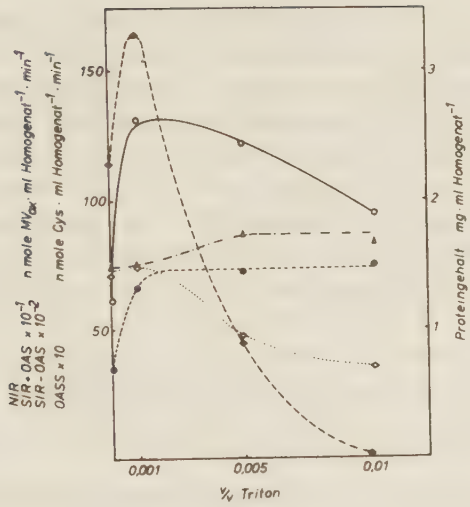


Abb.16: Solubilisieren von mechanisch aufgebrochenem Zellhomogenat in Puffer mit unterschiedlichem Gehalt an Triton X-100; Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von Sulfitreduktase (in Gegenwart und Abwesenheit von OAS), von Nitritreduktase und OASS

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

◆--◆ NIR ○—○ SIR + OAS Δ-·-·Δ Protein

◇·····◇ OASS ●---● SIR - OAS

bot die Verwendung des Detergenz den Vorteil einer erheblich kürzeren Solubilisierungsdauer.

Bei der im Anschluß an die Solubilisierung durchgeführten Fällung des abzentrifugierten Extraktes mit Ammoniumsulfat wurde die größte Ausbeute an Sulfit- und Nitritreduktase-Aktivität in leicht saurem Milieu erzielt. Der optimale Fällungsbereich lag zwischen 50 und 70% (siehe Material und Methoden).

2.1.3. Molekulargewichtsbereich der Sulfit- und Nitritreduktase

Für Sulfit- und Nitritreduktase wurden in der Literatur unterschiedliche Molekulargewichte veröffentlicht, deren Größenordnung gemäß den verschiedenen Isolierungsmethoden schwanken (Asada et al. 1969, Tamura et al. 1978, Aketagawa und Tamura 1980, Hucklesby und Hewitt 1970, Aparicio et al. 1975, Cárdenas et al. 1972, Vega und Kamin 1977, Zumft 1972, Ida et al. 1974, Hirasawa und Tamura 1979 und 1980). Die hier routinemäßig MVH-abhängig gemessene Sulfit- und Nitritreduktase, aufgearbeitet gemäß der beschriebenen Methode, fanden sich nach Gelfiltration über Sephacryl S 200 im Bereich zwischen 50 und 100 kdalton (Tab.9). Es handelte sich daher bei der Sulfitreduktase um das in der Literatur beschriebene "kleine" Enzym.

MG-Bereich	Aktivität nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.	
	Sulfitreduktase	Nitritreduktase
≧ 250.000	0	15,64
100.000-50.000	3,31	136,78
≦ 10.000	0	50,79

Tab.9: Molekulargewichtsbereich von Sulfit- und Nitritreduktase nach Gelfiltration über Sephacryl S 200
Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Aktivität der Sulfitreduktase wurde ohne das Cystein-bildende System gemessen

2.1.4. Testsystem für die (P)APS-reduzierende Aktivität

Zur Messung der partikulären (P)APS-reduzierenden Aktivität wurde die Aufarbeitung des Zellgewebes modifiziert; die Partikelpräparation ist im einzelnen im Kapitel über Material und Methoden beschrieben. Die von APS oder PAPS und Ferredoxin aus-

gehende Reduktionsreaktion war mit dem Cystein-bildenden System gekoppelt:

$$(P)APS \xrightarrow{Fd} [S^{2-}] \xrightarrow{OAS} Cys \ .$$

Als Testsystem für die (P)APS-reduzierende Aktivität konnte der Cystein-Nachweis mit Ninhydrin in Gegenwart von Cofaktoren wie DTE und GSH wegen zu hoher Blindwerte nicht angewendet werden. Aus diesem Grunde wurde ^{35}S-markiertes Adenylylsulfat eingesetzt, das gebildete ^{35}S-Cystein über Ionenaustauschchromatographie abgetrennt und anschließend ausgezählt (siehe Material und Methoden).

2.1.4.1. Reaktionskinetiken und Abhängigkeiten der (P)APS-reduzierenden Aktivität von der Extraktmenge

Reaktionskinetiken mit APS bzw. PAPS als Substrat und Abhängigkeiten der (P)APS-reduzierenden Aktivität von der Extraktmenge zeigen die Abb.17 und 18. Es fällt auf, daß die PAPS-abhängige Reduktionsreaktion etwa 4fach höhere Werte erreichte.

2.1.4.2. Einfluß von Thiolen auf die (P)APS-reduzierende Aktivität

Bei einem vergleichenden Aktivitätstest mit GSH, DTE und MSH als Cofaktoren (Tab.10) stellte sich heraus, daß nur GSH die Reduktionsreaktion in Partikeln mit APS als Substrat 4fach stimulierte, während es auf die PAPS-reduzierende Aktivität keinen Einfluß zeigte. Dem Routinetestansatz mit APS wurde daher stets 1,7 mM GSH zugesetzt. Freies Sulfit konnte in den Ansätzen mit APS und PAPS in Gegenwart von GSH nicht nachgewiesen werden.

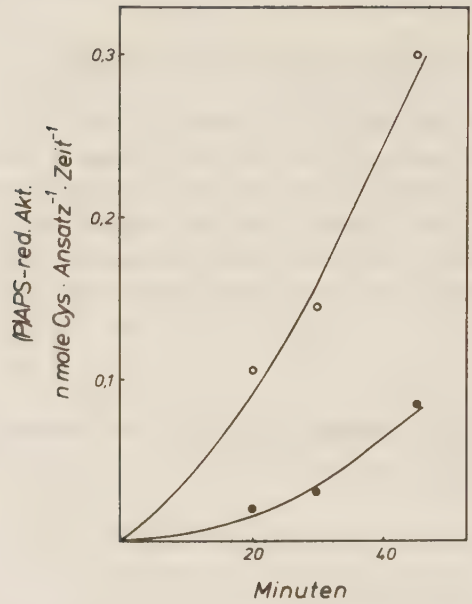


Abb.17: Kinetiken der APS- und PAPS-reduzierenden Aktivität

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; der Ansatz mit APS als Substrat enthielt kein GSH

● APS; ○ PAPS

Zusatz	relative Aktivität Substrat	
	APS	PAPS
ohne Thiol	= 1	= 1
+ GSH	3,95	1,04
+ DTE	1,01	1,28
+ MSH	1,09	0,72

Tab.10: Einfluß von Thiolen (jeweils 1,7 mM) auf die APS- und die PAPS-reduzierende Aktivität

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

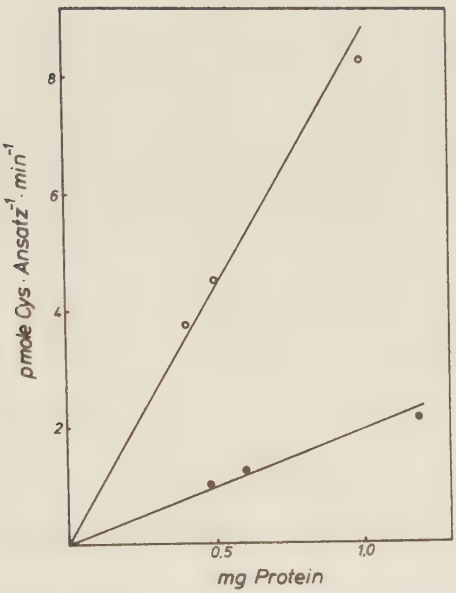


Abb. 18: Abhängigkeit der APS- und PAPS-reduzierenden Aktivität von der Proteinmenge

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; der Ansatz mit APS als Substrat enthielt kein GSH

● APS; ○ PAPS

2.1.5. Lokalisation der (P)APS-reduzierenden Aktivität

Wie aus Tab.11 ersichtlich, zeigten die partikuläre Fraktion und das Homogenat (zellfreier Überstand der 27000 x g-Zentrifugation) annähernd gleiche (P)APS-reduzierende Aktivitäten, während die lösliche Fraktion keine der genannten Aktivitäten enthielt. Homogenat und partikuläre Fraktion besaßen eine Sulfitreduktase-Aktivität, die im Homogenat 9fach und in den Partikeln 3,5fach höhere Werte erreichte als die (P)APS-reduzierende Aktivität.

Eine APS-Sulfotransferase-Aktivität war nach der Methode von Schmidt (1972) in den Partikeln nicht nachweisbar.

Substrat	Aktivität pMole Cys/Min. x mg Prot.		
	Homogenat	partikul.Frakt.	lösl.Frakt.
	S_{27}	P_{100}	S_{100}
^{35}S-APS	19	11,9	0
^{35}S-PAPS	12	8,0	0
$^{35}SO_3^{2-}$	115	45,7	-

Tab.11: (P)APS-reduzierende Aktivität und Sulfitreduktase-Aktivität im Zellhomogenat, in der partikulären und in der löslichen Fraktion

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; zur Messung der Sulfitreduktase-Aktivität wurde das Adenylylsulfat durch $^{35}SO_3^{2-}$ ersetzt

2.1.6. Testsystem für die Nitritreduktase

2.1.6.1. Nicht-enzymatische Reaktionen mit dem Elektronendonor

Bei der Aktivitätsmessung der Nitritreduktase trat spontan eine nicht-enzymatische Reaktion von Nitrit mit Methylviologen auf, hervorgerufen durch eine Schwermetallkatalyse. Diese mit einer lag-Phase beginnende Reaktion ließ sich durch EDTA oder BSA unterbinden (siehe Material und Methoden). EDTA besaß jedoch eine hemmende Wirkung auf die Nitritreduktase-Aktivität (Tab.12); deshalb wurden zum Routinetest im folgenden 2 mg BSA pro Ansatz eingesetzt.

Zusatz	Nitritreduktase-Aktivität nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.
10 µM EDTA	21,00 (26%)
2 mg BSA	81,72 (=100%)

Tab.12: Einfluß von EDTA auf die Nitritreduktase-Aktivität

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

Eine nicht-enzymatische Reaktion mit Ammonium-Ionen, wie sie Hewitt und Mitarbeiter für Benzylviologen fanden (Hewitt et al. 1975), trat mit Methylviologen weder in Gegenwart von 10 mM Ammoniumsulfat auf, noch mit durch Abkochen denaturiertem Enzymextrakt, der eventuell Rückstände von Ammoniumsulfat aus der Fällung enthielt.

2.1.6.2. Abhängigkeit der Nitritreduktase-Aktivität vom pH-Wert, von der Substrat- und Elektronendonor-Konzentration und von der Proteinmenge

Der für die Nitritreduktase-Aktivität optimale pH-Bereich lag zwischen 7,4 und 7,8 (Abb.19). Bei niedrigeren Werten trat trotz Anwesenheit von BSA erneut eine nicht-enzymatische Oxidation des Methylviologens auf.

Die Abhängigkeit der Nitritreduktase-Aktivität von der Substrat-Konzentration folgte einer normalen Michaelis-Menten-Beziehung (Abb.20). Der apparente K_M-Wert für Nitrit betrug 1,8 µM.

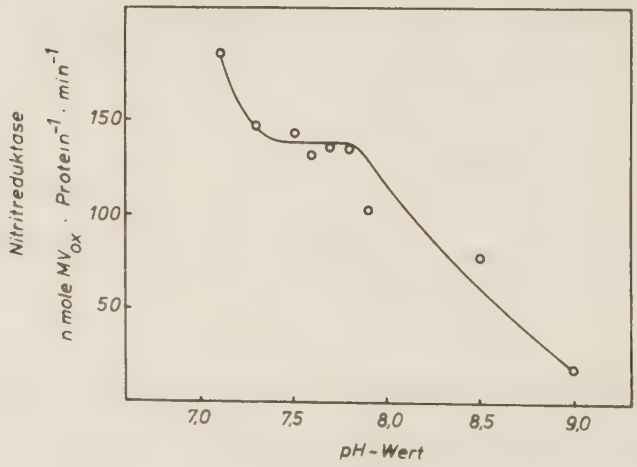


Abb.19: Abhängigkeit der Nitritreduktase-Aktivität vom pH-Wert

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

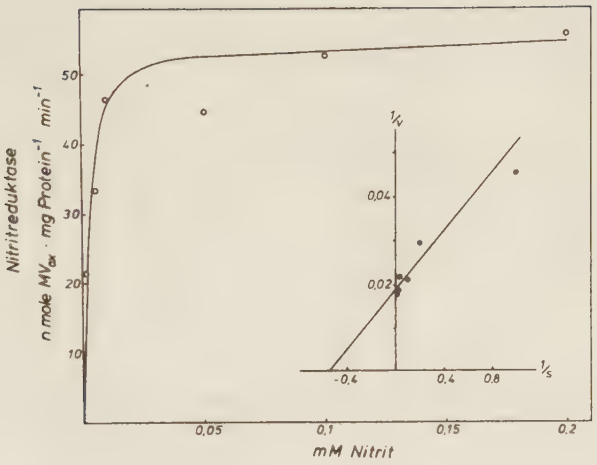


Abb.20: Abhängigkeit der Nitritreduktase-Aktivität von der Substratkonzentration
Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

Die Abhängigkeit von der Elektronendonor-Konzentration (Abb.21) nahm einen zweiphasigen Verlauf: einer anfänglichen Phase geringer Affinität folgte ab einer Konzentration von etwa 60 µM ein Bereich hoher Affinität. Sättigung war oberhalb einer Konzentration von etwa 100 µM erreicht; an diesem Punkt lagen rund 30% des eingesetzten Methylviologens in reduzierter Form vor. Die Konzentration des Elektronendonors im Ansatz entsprach der im Sulfitreduktase-Test verwendeten, um beide Enzyme unter vergleichbaren Bedingungen messen zu können.

Die ermittelte Stöchiometrie von umgesetztem Nitrit (colorimetrisch bestimmt als Azofarbkomplex, siehe Material und Methoden) zu oxidiertem Methylviologen lag im Bereich von 1:6 (Tab. 13).

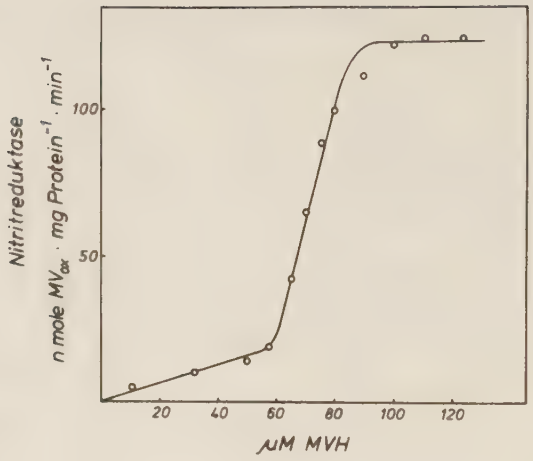


Abb.21: Abhängigkeit der Nitritreduktase-Aktivität von der Elektronendonor-Konzentration

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

Experiment	$\frac{\text{nMole } NO^{2-}\text{ umgesetzt}}{\text{Min. x Ansatz}}$	$\frac{\text{nMole } MV_{ox}}{\text{Min. x Ansatz}}$	Stöch. NO^{2-} : MV_{ox}
1	0,58	3,94	1 : 7
2	1,82	10,00	1 : 6
3	2,50	12,01	1 : 5

Tab.13: Nitritreduktion: Stöchiometrie von umgesetztem Nitrit zu oxidiertem Methylviologen

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

Die Nitritreduktase-Aktivität zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis zu einem Proteingehalt von etwa 0,5 mg pro Ansatz (Abb.22). Oberhalb dieses Wertes wurde die Methylviologen-Konzentration wegen der hohen Reaktionsgeschwindigkeit zu rasch limitierend.

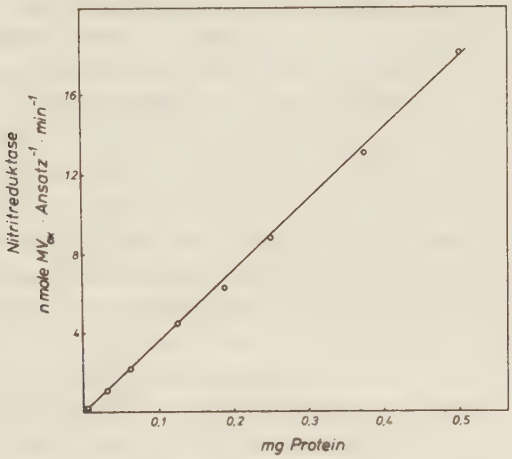


Abb.22: Abhängigkeit der Nitritreduktase-Aktivität von der Proteinmenge

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

2.1.7. Zusammenfassung des methodischen Teils

Methodische Voraussetzungen zur Untersuchung der Regulation eines Enzyms sind ein Testsystem, das optimale Bedingungen für die Aktivitätsmessung schafft und ein Verfahren zur möglichst vollständigen, schonenden Extraktion.

Die photometrische Messung der Sulfit- und Nitritreduktion durch Methylviologen unter anaeroben Bedingungen erwies sich als ein empfindliches System mit einer Nachweisgrenze von 0,1 nMol MV_{ox}/Min.

Die Sulfitreduktase wurde durch hohe Konzentrationen ihres Substrats gehemmt; sie ließ sich jedoch aktivieren durch kurz-

zeitige Vorinkubation mit niedrigen Sulfitkonzentrationen, deren Höhe vom Proteingehalt im Ansatz abhängig war. Der apparente K_M-Wert für das Substrat wurde ermittelt zu 0,65 mM. Die Stöchiometrie von gebildetem Sulfid zu oxidiertem Methylviologen lag im Bereich von 1:6.

Die Sulfitreduktion ließ sich durch das Cystein-bildende System (OASS/OAS) stimulieren, wobei die O-acetylserin-Sulfhydrylase in einem 800- bis 1000fachen Aktivitätsüberschuß vorhanden sein mußte, um maximale Sulfitreduktase-Aktivität zu erzielen. Als Endprodukt dieser Reaktionskette

$$SO_3^{2-} \xrightarrow{MVH} S^{2-} \xrightarrow{OAS} Cys$$

wurden Sulfid und Cystein nachgewiesen, die in einem von Proteinmenge und Inkubationsdauer abhängigen Verhältnis entstanden. Die Stöchiometrie von gebildetem Endprodukt (S^{2-} und Cys) zu oxidiertem Methylviologen betrug bei kürzeren Inkubationszeiten etwa 1:6. Der apparente K_M-Wert für Sulfit wurde bestimmt zu 0,25 mM. In Gegenwart des Cystein-bildenden Systems war eine Aktivierung der Sulfitreduktase durch Vorinkubation mit niedrigen Sulfit-Konzentrationen nicht mehr erforderlich.

Die zum überwiegenden Teil in der partikulären Fraktion gefundene Sulfitreduktase-Aktivität war durch 1-2stündiges Stehenlassen des mechanisch aufgebrochenen Homogenats in hypotonischem Puffer oder mit 0,001 v/v Triton X-100 in Lösung zu bringen ohne Beeinträchtigung der beiden anderen maßgeblichen Enzyme Nitritreduktase und OASS.

Nach Gelchromatographie über Sephacryl S 200 wurden Sulfit- und Nitritreduktase im Molekulargewichtsbereich zwischen 50 und 100 kdalton gefunden. Bei der Sulfitreduktase handelte es sich demnach um das in der Literatur beschriebene "kleine" Enzym.

Die Partikel-gebundene (P)APS-reduzierende Aktivität wurde unter Verwendung von ^{35}S-markierten Adenylylsulfaten mit Ferredoxin als Elektronendonor durch Ankopplung des Cystein-bildenden Systems als ^{35}S-Cystein gemessen. Die APS-abhängige Reduktionsreaktion ließ sich durch 1,7 mM GSH 4fach stimulieren und erreichte damit die Werte der PAPS-reduzierenden Aktivität. DTE

und MSH zeigten keinen Einfluß auf die APS-reduzierende Aktivität. Die PAPS-abhängige Reduktionsreaktion wurde von keinem der eingesetzten Thiole stimuliert. Freies Sulfit war in den Ansätzen nicht nachweisbar. Die (P)APS-reduzierende Aktivität wurde nur in der partikulären Fraktion (P_{100}), nicht aber in der löslichen Fraktion (S_{100}) gefunden. Daneben besaßen die Partikel Sulfitreduktase-Aktivität, jedoch keine APS-Sulfotransferase-Aktivität.

Die beim Testsystem für die Nitritreduktase auftretende nicht-enzymatische Reaktion des Nitrits mit reduziertem Methylviologen ließ sich ohne Beeinträchtigung der Nitritreduktase-Aktivität durch Zusatz von BSA unterbinden. Der apparente K_M-Wert der Nitritreduktase für das Substrat wurde bestimmt zu 1,8 µM. Die Stöchiometrie von reduziertem Nitrit zu oxidiertem Methylviologen lag im Bereich von 1:6.

2.2. In vivo-Experimente

Im Anschluß an die biochemische Charakterisierung der Sulfit- und Nitritreduktase-Aktivität sowie der (P)APS-reduzierenden Aktivität wurde unter Berücksichtigung der von Mikroorganismen bekannten Prinzipien der Enzymregulation der Versuch unternommen, die biochemische und physiologische Relevanz der Sulfitreduktase durch in vivo-Experimente mit Kulturen dedifferenzierter pflanzlicher Zellen zu klären. Veränderungen im Muster der enzymatischen Aktivität können dabei zeigen, ob und wann ein Enzym an einem Stoffwechselweg beteiligt ist.

2.2.1. Anzucht und Wachstum der Zellkulturen

Die hier verwendeten Suspensionskulturen von Catharanthus roseus wurden entweder S-autotroph auf Sulfat oder S-heterotroph auf S°-Schwefel gezogen (siehe Material und Methoden). Die Versorgung mit Stickstoff erfolgte in beiden Fällen N-mixotroph.

Abb.23 zeigt den Sulfatgehalt des Mediums S-autotroph gezogener Kulturen im Vergleich zum Wachstum des Zellgewebes. Über einen Zeitraum von 9 Tagen war Sulfat stets in ausreichenden Mengen vorhanden; das Wachstum der Kulturen wurde nicht durch einen Mangel an Sulfat begrenzt.

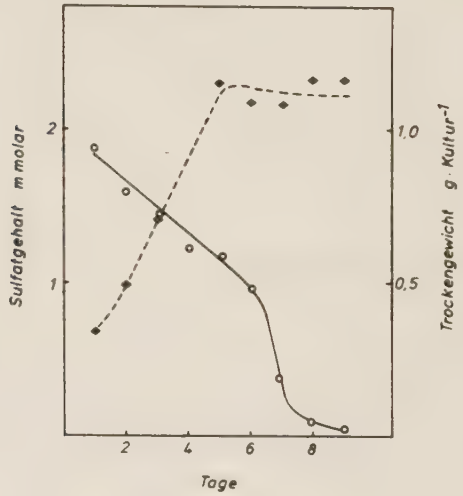


Abb. 23: Sulfatgehalt und Trockengewicht S-autotroph gezogener Zellkulturen von Catharanthus roseus

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

O—O Sulfatgehalt ◆---◆ Trockengewicht

Den typischen Wachstumsverlauf von Suspensionskulturen in diskontinuierlicher Kultur zeigt die Abb.24a. Auf eine kurze Phase verzögerten Wachstums (lag) folgt eine Periode, in der die Zellen an Zahl und Masse logarithmisch zunehmen. Nach Verbrauch der Nährstoffe geht das Wachstum der Kultur schließlich in die stationäre Phase über.

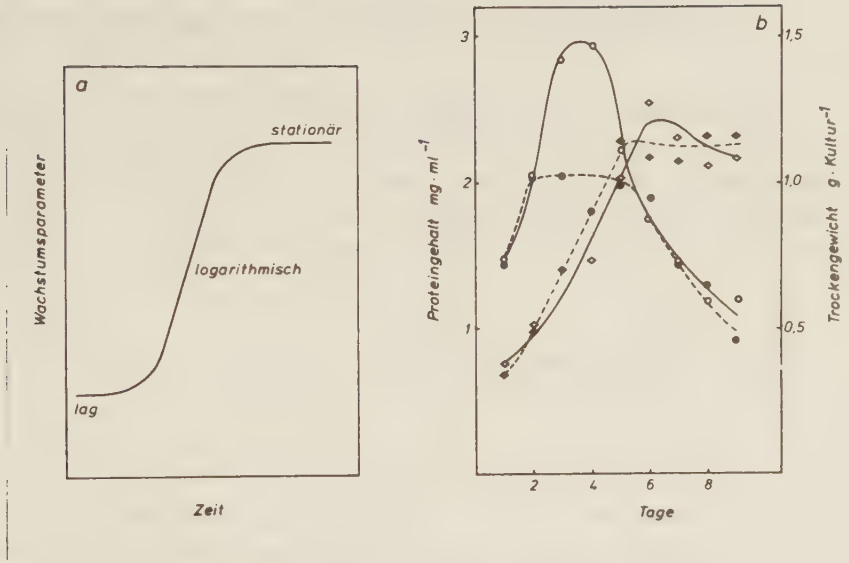


Abb.24 a: Wachstumsverlauf einer diskontinuierlich gezogenen Suspensionskultur

b: Wachstum (Trockengewicht) und Gehalt an löslichem Protein S-autotroph und S-heterotroph gezogener Zellkulturen von Catharanthus roseus

Trockengewicht: ◆---◆ S-autotroph
◇——◇ S-heterotroph

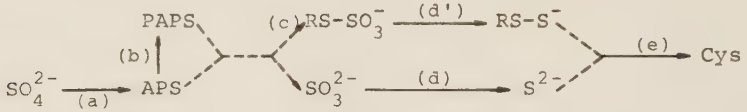
Proteingehalt: ●---● S-autotroph
○——○ S-heterotroph

Das Zellwachstum der Catharanthus-Kulturen (gemessen als Trockengewicht) folgte dem beschriebenen Verlauf weitgehend, sowohl bei S-autotropher als auch bei S-heterotropher Anzucht (Abb.24b). Eine lag-Phase war nach 24stündigem Wachstum nicht mehr zu erkennen; die logarithmische Wachstumsphase war am 5./6. Kulturtag beendet.

Die Gehalte an löslichem Protein, als Maß für metabolische Veränderungen, unterschieden sich in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellen vom 3. bis zum 5. Tag erheblich voneinander; die Werte lagen bei S-heterotrophen Kulturen im Maximum um etwa 50% höher.

2.2.2. Aktivitätsverlauf der Sulfat-assimilierenden Enzyme in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen

Aus den drei Abschnitten der assimilatorischen Sulfatreduktion (Aktivierung, Reduktion, Cystein-Biosynthese) wurde jeweils ein Enzym zur Aktivitätsbestimmung ausgewählt (ATP-Sulfurylase (a), Sulfitreduktase (d), OASS (e)), um auf diese Weise einen Überblick über die gesamte Enzymsequenz zu schaffen.



In S-heterotrophen Kulturen wurde neben der Sulfitreduktase auch die (P)APS-reduzierende Aktivität gemessen, die, als vermutlich physiologisch relevante Reaktion, Transfer (c) und Reduktion (d') einschließt.

2.2.2.1. Aktivitätsverlauf der ATP-Sulfurylase

Die ATP-Sulfurylase (a) lag in S-heterotroph gezogenen Kulturen bis zum Ende der linearen Wachstumsphase am 5./6. Kulturtag reprimiert* vor, verglichen mit der Aktivität in S-autotrophen Zellen (Abb.25). Der beiden Enzymaktivitäten gemeinsame Anstieg während der ersten 3 Tage war bei Wachstum der Kulturen auf verschiedenen Schwefelquellen unterschiedlich ausgeprägt: In S-autotrophen Kulturen lag das Aktivitätsmaximum um 40%, in

* Da die Regulationsvorgänge auf molekularer Ebene nicht untersucht wurden, sollen die Ausdrücke Repression, Derepression, Induktion und Hemmung lediglich das apparente Verhalten von Enzymaktivitäten beschreiben.

S-heterotrophen Kulturen um 20% über dem Ausgangswert. Die Höhe des Aktivitätsmaximums war negativ korreliert mit der Aktivität der OASS: einer stark derepremierten OASS entsprach eine schwach derepremierte ATP-Sulfurylase in S-heterotrophen Kulturen. Das umgekehrte Verhältnis lag in S-autotrophen Kulturen vor. Dies deutet auf einen engen regulatorischen Zusammenhang beider Enzyme hin.

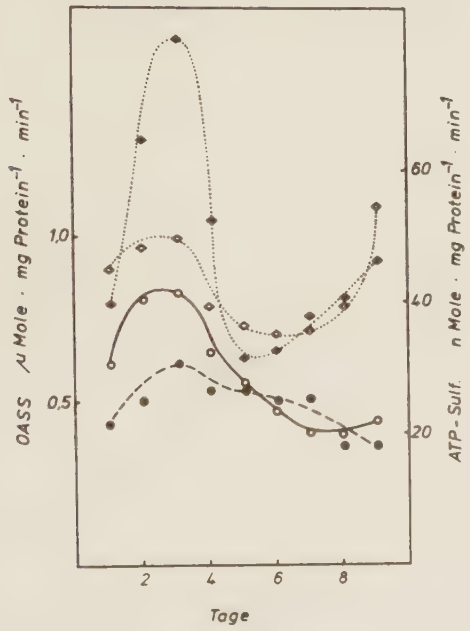


Abb.25: Aktivität der ATP-Sulfurylase in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus im Vergleich zur Aktivität der OASS

ATP-Sulfurylase: S-autotroph
S-heterotroph

OASS : S-autotroph
S-heterotroph

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

2.2.2.2. Aktivitätsverlauf der Sulfitreduktase, Vergleich mit der (P)APS-reduzierenden Aktivität in S-heterotrophen Zellkulturen

Bei der Sulfitreduktase (d) (Abb.26) war in S-autotrophen und S-heterotrophen Kulturen zunächst ein Aktivitätsabfall auf ein Minimum zu verzeichnen, das bei etwa gleichen Ausgangswerten in S-heterotrophen Zellen um etwa 40% höher lag. Die anschließende Derepression der enzymatischen Aktivität erfolgte

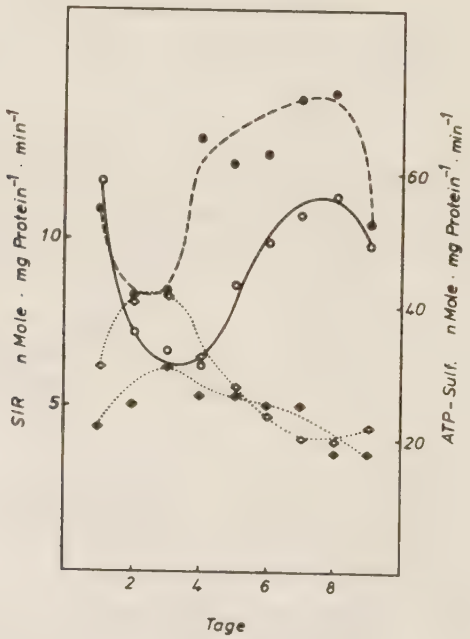


Abb.26: Aktivität der Sulfitreduktase in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus im Vergleich zur Aktivität der ATP-Sulfurylase

Sulfitreduktase: S-autotroph
S-heterotroph

ATP-Sulfurylase: S-autotroph
S-heterotroph

Versuchsdurchführung siehe Material u. Methoden

in S-heterotrophen Kulturen um einen Tag eher (4. Kulturtag) und steiler (innerhalb eines Tages um 50%) als in S-autotrophen Kulturen. Das Aktivitätsmaximum, das zu Beginn der stationären Wachstumsphase (7. Tag) erreicht war, lag bei S-heterotropher Anzucht der Zellen um 30% über demjenigen in S-autotrophen Kulturen; hier erreichte die Sulfitreduktase-Aktivität am 7./8. Tag gerade die Höhe des Ausgangswertes. Vom 2. bis zum 8. Kulturtag enthielten S-heterotroph gezogene Zellen eine deutlich höhere Sulfitreduktase-Aktivität als S-autotrophe Zellen.

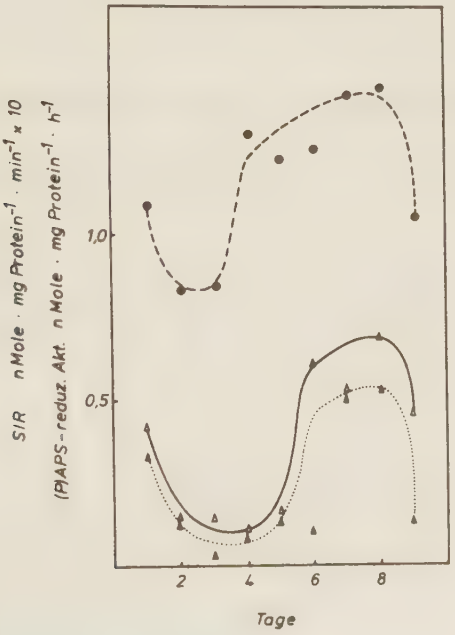


Abb.27: (P)APS-reduzierende Aktivität in S-heterotroph gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus im Vergleich zur Aktivität der Sulfitreduktase

△——△ APS-reduzierende Aktivität
▲·····▲ PAPS-reduzierende Aktivität
●- - -● Sulfitreduktase

Versuchsdurchführung siehe Material u. Methoden

Der Aktivitätsverlauf der Sulfitreduktase war negativ korreliert mit dem der ATP-Sulfurylase: Einer Derepression der ATP-Sulfurylase stand eine ihrer Ausprägung entsprechende Repression der Sulfitreduktase gegenüber.

Die APS- und PAPS-reduzierenden Aktivitäten (c und d') verliefen parallel zueinander (Abb.27). Ihr Aktivitätsverlauf entsprach etwa demjenigen der Sulfitreduktase. Der Wiederanstieg der Aktivität nach der anfänglichen Repression erfolgte bei der Sulfitreduktase um 2 Tage eher. Hierfür mögen technische Unterschiede in der Zellanzucht verantwortlich sein, denn die (P)APS-reduzierende Aktivität und die Sulfitreduktase wurden unabhängig voneinander in verschiedenen Zellkulturen gemessen.

2.2.2.3. Aktivitätsverlauf der O-acetylserin-Sulfhydrylase

Die Aktivitäten der OASS (e) in S-autotrophen und S-hetero-

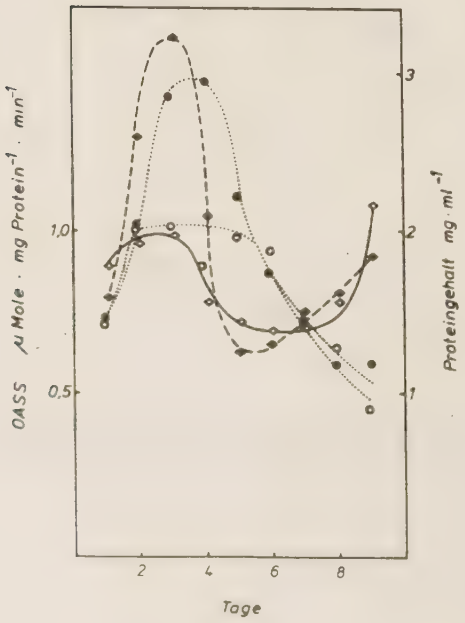


Abb. 28:
Aktivität der OASS in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus im Vergleich zum Gehalt an löslichem Protein

OASS:
◇——◇ S-autotroph
◆- - -◆ S-heterotroph

Proteingehalt:
○·····○ S-autotroph
●·····● S-heterotroph

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

trophen Kulturen (Abb.28) nahmen prinzipiell einen vergleichbaren Verlauf mit einer Derepression zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (2./3. Kulturtag) und einer anschließenden Repression bis auf Werte um 30% unterhalb der Ausgangsaktivität. Die Derepression war jedoch im S-heterotrophen Kulturen wesentlich stärker ausgeprägt: Die Aktivität der OASS stieg hier innerhalb von 2 Tagen um 100% an gegenüber einer Aktivitätszunahme um etwa 15% in S-autotrophen Zellen. Dieser Aktivitätsverlauf stand in Korrelation zum Proteingehalt in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Kulturen. In Zellen, die auf reduziertem Schwefel

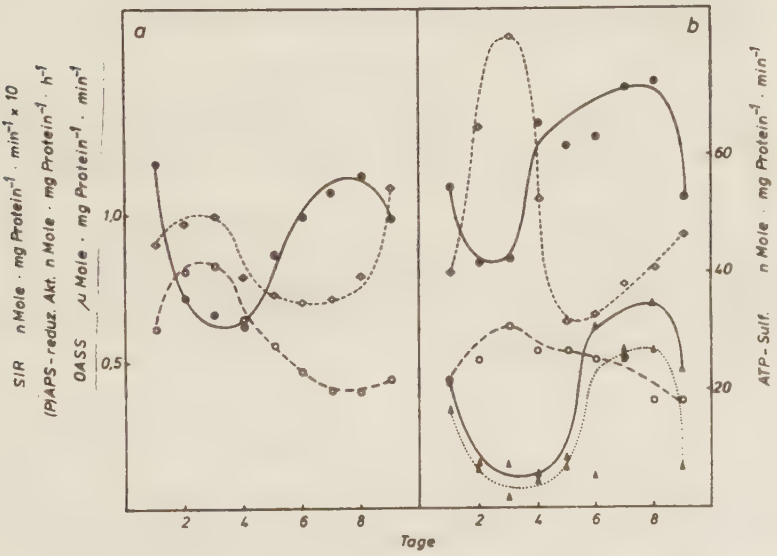


Abb.29 a: Aktivität der ATP-Sulfurylase, der Sulfitreduktase und der OASS in S-autotroph gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus

b: Aktivität der ATP-Sulfurylase, der Sulfitreduktase, der (P)APS-reduzierenden Aktivität und der OASS in S-heterotroph gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus

O—O ATP-Sulfurylase
●—● Sulfitreduktase
Δ—Δ APS-red. Akt.
◇----◇ OASS
▲.....▲ PAPS-red. Akt.

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

wuchsen, verdoppelte sich der Proteingehalt ebenfalls innerhalb der ersten 3 Kulturtage, während er in Zellen, die auf Sulfat gezogen waren, nur um 40% zunahm.

Der Aktivitätsverlauf der drei im vorliegenden Experiment gemessenen Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion änderte sich bei S-heterotropher Anzucht der Kulturen nicht prinzipiell, verglichen mit S-autotroph gezogenen Zellen. Maxima und Minima der enzymatischen Aktivitäten waren in beiden Kulturen jedoch in ihrer Höhe unterschiedlich ausgeprägt (Abb.29). Die ATP-Sulfurylase lag in S-heterotrophen Zellen stark reprimiert vor, während für Sulfitreduktase und OASS gegenüber den entsprechenden Enzymaktivitäten in S-autotrophen Zellen eine deutliche Aktivitätssteigerung gefunden wurde.

2.2.3. Aktivitätsverlauf der Stickstoff-assimilierenden Enzyme in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen

Um festzustellen, wie sich die Versorgung der Zellkulturen mit unterschiedlichen Schwefelquellen auf die Aktivität der Stickstoff-assimilierenden Enzyme auswirkte, wurde die gesamte Sequenz (NAR, NIR, Gln-Syn., GOGAT und die NADH- und NADPH-abhängige Glu-DH) gemessen.

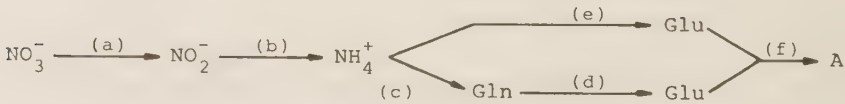


Abb.30a und b geben einen Überblick über die enzymatischen Aktivitäten in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen

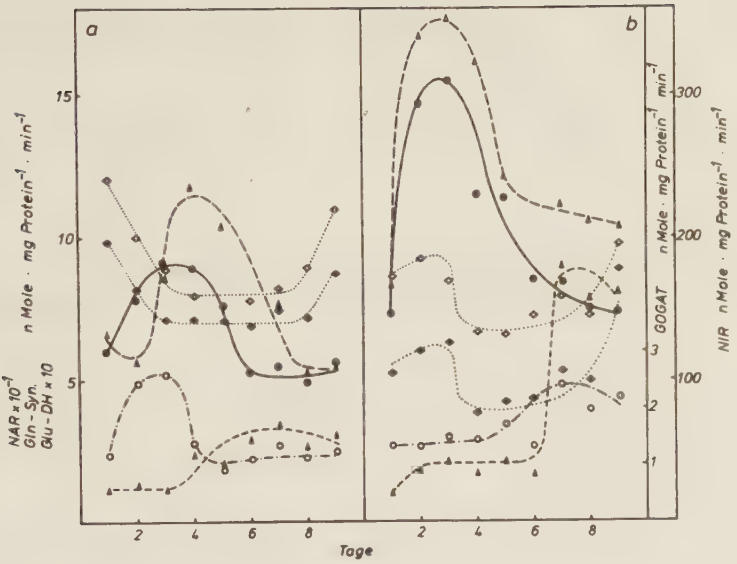


Abb.30: Aktivität der NAR, der NIR, der Gln-Syn., der GOGAT und der Glu-DH in S-autotroph (a) und S-heterotroph (b) gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus

▲----▲ NAR
●——● NIR
Δ— — —Δ Gln-Syn.
O-·-·-O GOGAT
◆·····◆ NADPH-abhg. Glu-DH
◇·····◇ NADH-abhg. Glu-DH

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

2.2.3.1. Aktivitätsverlauf der Nitratreduktase, Nitritreduktase und Glutamin-Synthetase

In S-heterotroph gezogenen Zellkulturen stieg die Aktivität der Nitratreduktase (a) vom 1. zum 2. Kulturtag um das Zweifache auf ein Niveau, das auch etwa doppelt so hoch lag wie in S-autotrophen Zellen (Abb.31a,b). Nitritreduktase (b) und Glutamin-Synthetase (c) reagierten auf reduzierten Schwefel in der gleichen Weise: Beide Aktivitäten stiegen bis zum 2./3. Kulturtag um 100% an. Im Maximum lag die Aktivität der Nitritreduktase

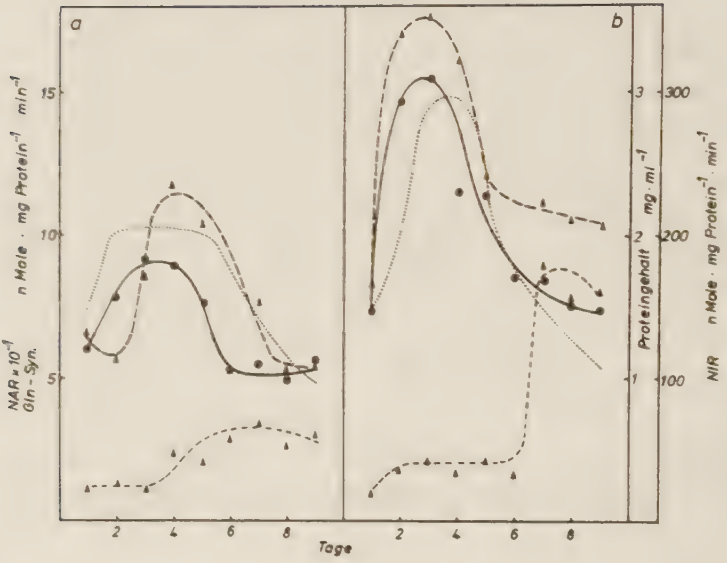


Abb.31: Aktivität der Nitratreduktase, der Nitritreduktase und der Glutamin-Synthetase sowie Gehalt an löslichem Protein in S-autotroph (a) und S-heterotroph (b) gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus

▲----▲ NAR ▲— —▲ Gln-Syn.
●——● NIR ····· Proteingehalt

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

um 70% und die der Gln-Synthetase um 50% über den entsprechenden Aktivitäten in S-autotrophen Zellen. Dieses Enzymmuster wurde in beiden Kulturen im Proteingehalt reflektiert: In S-heterotroph gezogenen Zellen nahm der Gehalt an löslichem Protein bis zum 3./4. Tag ebenfalls um das Doppelte zu und lag damit um 50% über demjenigen in S-autotrophen Zellen.

Der Aktivitätsanstieg der Nitratreduktase in der zweiten Hälfte der Generationszeit erfolgte in S-heterotrophen Kulturen ebenfalls drastischer als in Zellen, die auf Sulfat gezogen worden waren: Im Maximum wurde ein fast dreifach höherer Wert erreicht als in S-autotrophen Kulturen.

In ihrem Verlauf unterschieden sich die Aktivitäten von Nitratreduktase, Nitritreduktase und Glutamin-Synthetase in S-autotrophen und S-heterotrophen Zellkulturen nicht prinzipiell. Bei Wachstum der Zellen auf reduziertem Schwefel lagen die Aktivitäten der drei Enzyme jedoch beträchtlich höher als bei Wachstum auf Sulfat.

2.2.3.2. Aktivitätsverlauf der NH_4^+-assimilierenden Enzyme Glutamin-Synthetase/GOGAT und Glutamat-Dehydrogenase

Die Aktivitäten der NADH- und der NADPH-abhängigen Glutamat-Dehydrogenasen (e) verliefen in S-autotrophen und S-heterotrophen Kulturen parallel zueinander (Abb.32a,b); die NADPH-abhängige Enzymaktivität lag bei S-autotropher Anzucht der Zellen um 20% und bei S-heterotropher Anzucht um 45% niedriger als die NADH-abhängige. In S-autotrophen Kulturen zeigten die Glu-Dehydrogenasen einen zur Glutamin-Synthetase (c) antagonistischen Aktivitätsverlauf: sie fielen ab, während die Gln-Synthetase-Aktivität anstieg; fast die gesamte logarithmische Wachstumsphase hindurch blieb die Aktivität der Glu-Dehydrogenasen auf einem konstant niedrigen Niveau. Umgekehrt nahm ihre Aktivität wieder zu, nachdem die Gln-Synthetase den Ausgangswert erreicht hatte. Dieser Verlauf war in S-heterotrophen Zellkulturen leicht modifiziert. Während der ersten drei Kulturtage, in denen die Gln-Synthetase ihre Aktivität verdoppelte, stiegen auch die Aktivitäten der Glu-Dehydrogenasen um etwa 10% an. Erst am 4. Tag fielen sie auf ein um 25% niedriger liegendes Niveau ab.

In S-heterotrophen Zellen lagen die Aktivitäten der Glu-Dehydrogenasen, ganz im Gegensatz zur Gln-Synthetase, niedriger als in S-autotrophen Zellen: Das NADH-abhängige Enzym erreichte um etwa 20% niedrigere Werte verglichen mit S-autotrophen Kulturen, die Aktivität der NADPH-abhängigen Glu-Dehydrogenase lag um 60% niedriger.

Die GOGAT (d) änderte ihren Aktivitätsverlauf bei Wachstum der Kulturen auf unterschiedlichen Schwefelquellen antagonistisch

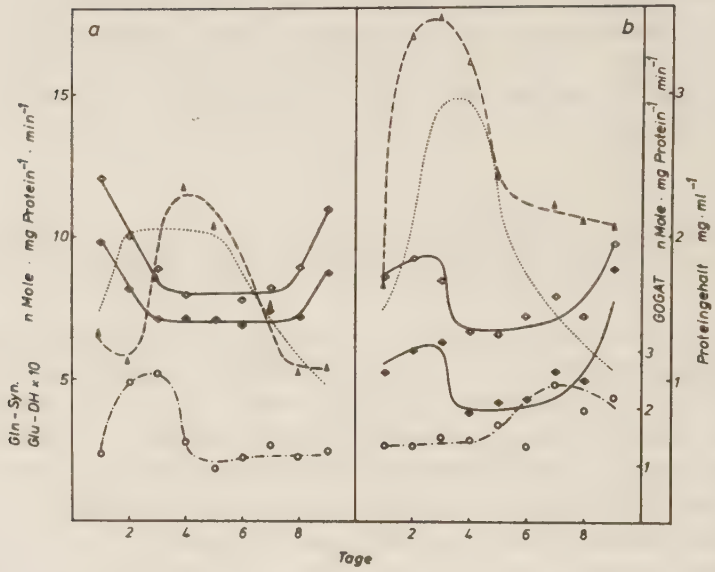


Abb.32: Aktivität der Gln-Synthetase, der GOGAT und der Glu-Dehydrogenasen sowie Gehalt an löslichem Protein in S-autotroph (a) und S-heterotroph (b) gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus

Δ— —Δ Gln-Syn.
O-·-·-O GOGAT
◆——◆ NADPH-abhg. Glu-DH
◇——◇ NADH-abhg. Glu-DH
····· Proteingehalt

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

zur Glu-Dehydrogenase-Aktivität (e). In S-autotrophen Zellen war sie in der Phase maximaler Proteinsynthese aktiv (2./3.Tag), während die Aktivität der Glu-Dehydrogenasen abnahm. Bei Wachstum der Kulturen auf reduziertem Schwefel blieben die Glu-Dehydrogenasen in der Phase stark gesteigerter Proteinsynthese aktiv; die Aktivität der GOGAT stieg dagegen erst am 5. Kulturtag an, nachdem die Glu-Dehydrogenasen ihr Aktivitätsminimum erreicht hatten.

2.2.4. Vergleich der Muster der enzymatischen Aktivitäten von Sulfit- und Nitritreduktase

Sowohl in S-autotroph als auch in S-heterotroph gezogenen Zellkulturen verliefen die Aktivitäten der Sulfitreduktase und der Nitritreduktase antagonistisch (Abb.33a,b). Zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase wurde in beiden Kulturen die Sulfitreduktase reprimiert, die Nitritreduktase dagegen dereprimiert; umgekehrt stieg anschließend die Aktivität der Sulfitreduktase an, während die Nitritreduktase-Aktivität abnahm. Reduzierter Schwefel im Nährmedium von Catharanthus-Kulturen wirkte sich auf die beiden Enzyme aktivitätssteigernd aus: Die Aktivität der Sulfitreduktase lag im Maximum um 30% höher, die der Nitritreduktase um 70%.

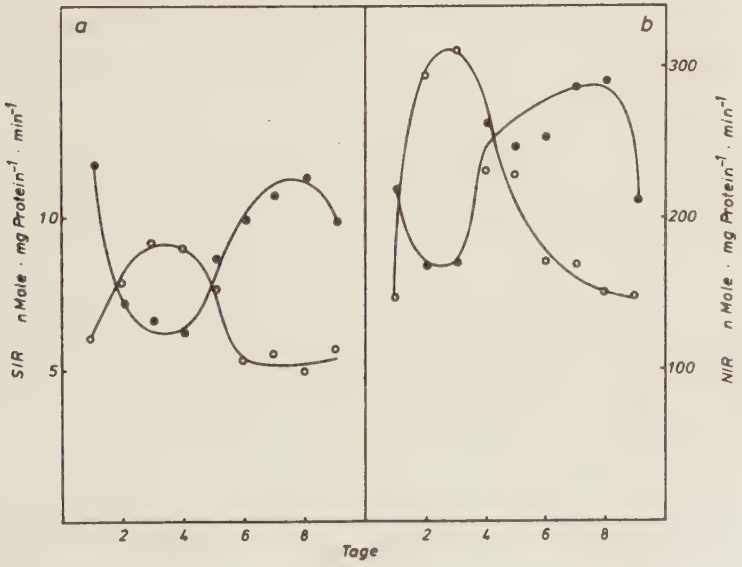


Abb.33: Aktivität der Sulfit- und Nitritreduktase in S-autotroph (a) und S-heterotroph (b) gezogenen Zellkulturen von Catharanthus roseus

● Sulfitreduktase ○ Nitritreduktase

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden

3. Diskussion

Die an der assimilatorischen Sulfatreduktion in Pflanzen beteiligten Enzyme sind für die Aktivierung des Sulfats und für die Cystein-Biosynthese bekannt und zum Teil bereits gut charakterisiert. Über die eigentliche Schlüsselreaktion der Sulfatassimilation, die Reduktion des Sulfitschwefels zum Sulfid, liegen dagegen sehr unterschiedliche Befunde vor.

3.1. Reduktion des Sulfitschwefels

Eine Sulfitreduktase, die in einem 6 Elektronen übertragenden Schritt Sulfit zu Sulfid reduziert (Einleitung Gl.IV') ist aus verschiedenen Organismen isoliert und zum Teil hochgereinigt worden (Tamura 1965, Tamura et al. 1967, Asada et al. 1969, Murphy et al. 1974). Dieses Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 84000 (Asada et al. 1969) enthält, wie die Sulfitreduktase aus E. coli (MG ∿670 000; Siegel et al. 1973) Sirohäm als funktionelle Gruppe (Murphy et al. 1974), jedoch kein Flavin (Asada et al. 1969), welches die mikrobielle Sulfitreduktase dazu befähigt, NADPH als Elektronendonor zu verwenden (Yoshimoto und Sato 1967, Siegel et al. 1973). Die pflanzliche Sulfitreduktase dagegen akzeptiert Elektronen von Methylviologen und Ferredoxin (Tamura 1965, Asada 1967, Tamura et al. 1967, Murphy et al. 1974, Tamura und Hosoi 1979). Erst kürzlich wurde mit einem neuen Reinigungsverfahren eine Sulfitreduktase aus Spinat isoliert, die aufgrund ihrer Molekülgröße (270 000) und ihrer spektroskopischen Eigenschaften dem Hämoproteinanteil der Sulfitreduktase aus E. coli sehr ähnlich ist (Tamura et al. 1978, Aketagawa und Tamura 1980). Dieses Flavin-freie Enzym besteht wie das mikrobielle Hämoprotein aus 4 identischen Untereinheiten, deren Molekulargewicht von je 71 000 in der Größenordnung desjenigen der zuvor beschriebenen "kleinen" Sulfitreduktase (84 000) liegt.

Daneben wurde eine Thiosulfonatreduktase untersucht (Schmidt 1973, Schmidt et al. 1974, Hennies 1974), die gebundenes Sulfit

zu gebundenem Sulfid umsetzt (Einleitung Gl.IV) und die als das in vivo die Reduktion katalysierende Enzym angesehen wird, da Sulfit und Sulfid in "freier" Form in Chloroplasten nicht nachgewiesen werden konnten (Schwenn 1970, Schmidt und Schwenn 1971). "Freies" Sulfit reduziert die Thiosulfonatreduktase nicht.

Während Sulfitreduktase und Thiosulfonatreduktase als lösliche Enzymaktivitäten gemessen werden konnten, fand sich eine Ferredoxin-abhängige sogenannte APS-reduzierende Aktivität in Membranpartikeln (Urlaub und Jankowski 1982, im Druck). Dieser Enzymkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa 700 000 umfaßt von APS ausgehend Transfer und Reduktion. Das gebildete Endprodukt läßt sich in Gegenwart von O-acetylserin-Sulfhydrylase und OAS als Cystein nachweisen. Die Einzelaktivitäten des Enzymkomplexes (S-Sulfotransferase, Thiosulfonatreduktase, Disulfidreduktase, Sulfitreduktase, FNR) waren erst nach Verlust der APS-reduzierenden Aktivität meßbar.

3.1.1. Aktivität der Sulfitreduktase in vitro

Die eigenen Untersuchungen mit Zellkulturen von Catharanthus ergaben, daß es sich bei der Sulfitreduktase um das in der Literatur beschriebene "kleine" Enzym handelte, welches Methylviologen-abhängig Sulfit zu Sulfid mit der erwarteten Stöchiometrie von 6:1 reduzierte.

Die Substratabhängigkeit der Sulfitreduktase folgte nicht einer normalen Michaelis-Menten-Beziehung, sondern zeigte eine Hemmung bei höheren Sulfitkonzentrationen. Diese Substrathemmung trat nicht auf, wenn die Konzentration durch sequentielle Zugabe steigender Mengen an Sulfit allmählich erhöht wurde oder dem eigentlichen Reaktionsstart eine kurzzeitige Inkubation mit einer niedrigen Substratkonzentration vorausging. Die zur Vorinkubation (in Gegenwart von Methylviologen) erforderliche Konzentration an Sulfit war abhängig vom Gehalt an Enzymprotein im Ansatz: Wurde sie für eine bestimmte Proteinmenge zu niedrig gewählt, konnte nach Reaktionsstart keine maximale Sulfitreduktase-Aktivität erzielt werden; fiel sie zu hoch aus, kam es wieder zu einer Substrathemmung. Die Vorinkubation war darüberhinaus zeitabhängig.

Es ist denkbar, daß das Enzym nach Isolierung teilweise in einer inaktiven oxidierten Form vorliegt, eventuell als Häm(Fe^{3+}). Möglicherweise kann es durch eine bestimmte niedrige Konzentration an Sulfit in die aktive reduzierte Form überführt werden:

$$2\ \text{Häm}(Fe^{3+}) + SO_3^{2-} + H_2O \longrightarrow 2\ \text{Häm}(Fe^{2+}) + HSO_4^- + H^+$$

Dies läßt sich aus Protein- und Zeitabhängigkeit der Vorinkubation schließen; denn in Gegenwart einer konstanten Sulfit-"Aktivierungskonzentration" wurde weder bei einem Überschuß an Enzymprotein noch bei einer verkürzten Inkubationsdauer nach Reaktionsstart maximale Sulfitreduktase-Aktivität erzielt. Sind sämtliche Enzymmoleküle nach Vorinkubation in die Form des Häm(Fe^{2+}) überführt, so scheint die Reaktion bei Zugabe hoher Sulfitkonzentrationen (eigentlicher Reaktionsstart) ungehindert abzulaufen

$$\text{Häm}(Fe^{2+}) + SO_3^{2-} \longrightarrow \text{Häm}(Fe^{2+})\text{-}SO_3^- \xrightarrow{6e} \text{Häm}(Fe^{2+})\text{-}S^- \longrightarrow \text{Häm}(Fe^{2+}) + S^{2-}$$

Demgegenüber scheint einer dieser Reaktionsschritte blockiert zu sein (vermutlich die Abdissoziation des Endproduktes, s.u.), wenn das Enzym in der oxidierten Form vorliegt.

Durch hohe Sulfitkonzentrationen läßt sich die inaktive Sulfitreduktase offensichtlich nicht aktivieren; eventuell wird sie geschädigt, indem Sulfit die Schwefel-Eisen-Cluster oder Disulfidbindungen des Enzyms spaltet. Aktivierte (d.h. optimal vorinkubierte) Sulfitreduktase bleibt dagegen durch hohe Konzentrationen an Substrat unbeeinträchtigt.

Diese Vorstellung von zwei verschiedenen Formen der Sulfitreduktase, deren eine die Reaktion blockiert, ist vereinbar mit Befunden der Arbeitsgruppe um Siegel über die Sulfitreduktase aus E. coli. Mit spektrometrischen Methoden konnten Siegel et al. am gereinigten Enzym zeigen, daß das Sirohäm in unterschiedlichen Oxidationszuständen vorliegen kann. Beide Formen, "Ferrohäm" und "Ferrihäm", existieren "frei" oder als Komplex mit SO_3^{2-} oder S^{2-} und sind ineinander überführbar; jedoch nur das "Ferrohäm" ist am Substratumsatz beteiligt, da allein der "Ferrohäm"-Komplex

in "freies Ferrohäm" und Sulfid dissoziiert (Rueger und Siegel 1976).

Die Aktivität der Sulfitreduktase konnte durch OAS spezifisch stimuliert werden. Die Beteiligung der O-acetylserin-Sulfhydrylase an dieser Aktivitätssteigerung wurde nachgewiesen und die Sulfitreduktion mit diesem Cystein-bildenden System gesättigt. Die Abhängigkeit der Umsatzrate der Sulfitreduktase von der OAS-Konzentration verlief zweiphasig: Der erste OAS-Sättigungspunkt war unabhängig vom Gehalt an Enzymprotein im Ansatz. Zwischen Proteingehalt und OAS-Konzentration am 2. Sättigungspunkt bestand eine lineare Beziehung. In Gegenwart des Cystein-bildenden Systems war eine Aktivierung der Sulfitreduktase durch sequentielle Zugabe steigender Substratmengen nicht mehr erforderlich.

Der erste Aktivitätsanstieg in Gegenwart von OAS und OASS ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das abdissoziierte Endprodukt der Reduktion, Sulfid, durch das Cystein-bildende System sofort abgefangen und auf diese Weise aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird:

$$SO_3^{2-} \xrightarrow{\text{MVH/SIR}} S^{2-} \xrightarrow{\text{OAS/OASS}} \text{Cys.}$$

In Gegenwart hoher OAS-Konzentrationen wäre ein direkter Zugriff auf das noch am Enzym gebundene Produkt denkbar, so daß der die Geschwindigkeit der Reduktion bestimmende Dissoziationsschritt (Rueger und Siegel 1976) umgangen wird. Dabei ist es möglicherweise ohne Bedeutung, in welcher Form das Hämoprotein vorliegt (als Häm(Fe^{2+}) oder als Häm(Fe^{3+})); denn hierdurch erklärte sich der Befund, daß eine sequentielle Zugabe steigender Substratmengen zu keiner weiteren Aktivitätssteigerung der Sulfitreduktase führte.

Als Endprodukte dieser durch O-acetylserin-Sulfhydrylase und OAS "gezogenen" Sulfitreduktion entstanden Sulfid und Cystein in einem von Inkubationsdauer und Gehalt an Enzymprotein abhängigen Verhältnis. Eine Überprüfung des Substratumsatzes des Cystein-bildenden Systems ergab, daß nur bei kurzen Inkubationszeiten und niedrigen Proteingehalten Sulfid vollständig zu

Cystein umgesetzt war. Dies kann ein Hinweis auf eine Cysteinabbauende, den Cystein-Desulfhydrasen aus Bakterien vergleichbare Aktivität im Extrakt sein (Collins et al. 1973, Kredich et al. 1973), die auch in Tabakkulturen gefunden wurde (Harrington und Smith 1980). Sie ist immer dann aktiv, wenn ein bestimmter Cysteinspiegel überschritten wird.

Die Stöchiometrie der Sulfitreduktion von oxidiertem Elektronendonor zu reduziertem Produkt ergab auch bei Ankopplung des die Reaktion "ziehenden" Cystein-bildenden Systems das Verhältnis von 6:1, wenn die beiden Endprodukte Sulfid und Cystein addiert wurden.

Die bislang in Mikroorganismen wie in Pflanzen gefundenen Sulfitreduktasen waren nach Aufarbeitung des Zellgewebes in der löslichen Fraktion meßbar, und es ist deshalb nie bezweifelt worden, daß es sich hierbei um ein lösliches Enzym handelt. Die eigenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß durch die üblichen Aufarbeitungsmethoden nicht die Gesamtmenge der Sulfitreduktase erfaßt wurde, sondern daß der überwiegende Teil des Enzyms noch an Membranpartikel gebunden war. Aus den Partikeln ließ es sich relativ leicht durch Stehenlassen des Homogenats in hypotonischem Puffer oder mit sehr niedrigen Konzentrationen eines Detergenz herauslösen. Die Sulfitreduktase ist demnach kein lösliches, sondern ein Membran-gebundenes Enzym.

3.1.2. Biochemische und physiologische Relevanz der Sulfitreduktase

Die Bedeutung der Sulfitreduktase in höheren Pflanzen ist fraglich, da "freies Sulfit" und "freies Sulfid" als Intermediate der assimilatorischen Sulfatreduktion nicht nachgewiesen werden konnten (Schwenn 1970, Schmidt und Schwenn 1971). Viele der gereinigten Sulfitreduktasen waren nicht spezifisch für Sulfit, sondern reduzierten ebenso Nitrit, Hydroxylamin und Cytochrom c (Schiff und Hodson 1973). Da für Sulfit- und Nitritreduktase weitgehende funktionelle und strukturelle Übereinstimmungen gefunden wurden (beide sind im Chloroplasten lokalisiert, katalysieren einen 6 Elektronen übertragenden Reduktionsschritt,

verwenden Ferredoxin als Elektronendonor und enthalten als funktionelle Gruppe Sirohäm; Fromageot et al. 1959, Kawashima und Asahi 1961, Betts und Hewitt 1966, Ramirez et al. 1966, Asada et al. 1969, Murphy et al. 1974, Hucklesby et al. 1976, Aparicio et al. 1975), lag die Annahme nahe, es könnte sich hierbei um identische Enzyme handeln. Bei verschiedenen Versuchen, Sulfitreduktase und Nitritreduktase zu isolieren und anzureichern, ergaben sich jedoch je nach angewandter Aufarbeitungs- und Reinigungsmethode unterschiedliche Molekulargewichte, Elektronendonorspezifitäten und Nebenaktivitäten (Hucklesby und Hewitt 1970, Hucklesby et al. 1976, Asada et al. 1969, Cárdenas et al. 1972, Zumft 1972, Ida et al. 1974, Aparicio et al. 1975, Vega und Kamin 1977, Tamura et al. 1978, Hirasawa und Tamura 1979 und 1980), so daß sich letztlich keine eindeutigen Aussagen über die Identität der Enzyme machen ließen.

An Mikroorganismen konnte gezeigt werden, daß Sulfit- und Nitritreduktase zwei verschiedene Enzyme sind. Die Sulfitreduktase wurde bei Wachstum der Zellen auf Cystein oder Sulfid reprimiert (Kemp et al. 1963, Kemp und Atkinson 1966, Jones-Mortimer 1968, Cherest et al. 1973, Kredich 1971), während ihre Aktivität in Gegenwart von NH_4^+ unbeeinflußt blieb (Kemp et al. 1963). Die Nitritreduktase ließ sich spezifisch durch Nitrit induzieren (Kemp und Atkinson 1966).

Da in Kultur gezogene pflanzliche Zellen in ähnlicher Weise zu handhaben sind wie Mikroorganismen, wurde versucht, durch Austausch des Sulfats im Nährmedium gegen reduzierten Schwefel einer Repression analoge Änderungen der assimilatorischen Sulfatreduktion und eventuell auch der Nitratreduktion von Catharanthus-Suspensionskulturen herbeizuführen. Es zeigte sich, daß die Aktivität der Sulfitreduktase bei Wachstum der Zellen auf reduziertem Schwefel nicht wie bei Mikroorganismen reprimiert, sondern im Gegenteil dereprimiert wurde (siehe Abb.26). Die Nitritreduktase blieb nicht, wie erwartet, unbeeinflußt durch die Änderung der Schwefelquelle; ihre Aktivität stieg in S-heterotroph gezogenen Zellkulturen beträchtlich an, wobei der Verlauf der Aktivität allerdings prinzipiell demjenigen in S-autotrophen Zellen glich (siehe Abb.31a,b). Eine Gegenüberstellung der enzymatischen Aktivitäten von Sulfit- und Nitritre-

duktase zeigte jedoch, daß beide sowohl in S-autotrophen als auch in S-heterotrophen Kulturen völlig antagonistisch verliefen (siehe Abb.33a,b). Dieser Aktivitätsverlauf schließt die vermutete molekulare Identität beider Enzyme aus. Die Sulfitreduktase scheint allerdings in Pflanzen anderen Regulationsprozessen zu unterliegen als in Mikroorganismen (siehe Kap.2 der Diskussion).

Ein zusätzlicher Beweis dafür, daß Sulfit- und Nitritreduktase auch in höheren Pflanzen zwei verschiedene Enzyme sind, ergab sich aus der Tatsache, daß die Nitritreduktase nach Aufschluß der Zellen in der löslichen Fraktion gemessen werden konnte, während der größte Teil der Sulfitreduktase zunächst durch Solubilisieren aus Membranpartikeln in Lösung gebracht werden mußte (siehe Kap. 1.1. der Diskussion).

Sulfit und Sulfid wurden in Chloroplasten gebunden an die Thiolgruppe eines niedermolekularen Proteins gefunden, was zu der Annahme führte, daß eine Thiosulfonatreduktase in vivo den Reduktionsschritt katalysiert (Schwenn 1970, Schmidt und Schwenn 1971):

$$RS\text{-}SO_3^- \xrightarrow{6e} RS\text{-}S^-$$

Diese Enzymaktivität ist mehrfach untersucht worden; ungeklärt blieb hierbei, in welcher Relation Sulfitreduktase und Thiosulfonatreduktase zueinander stehen (Schmidt 1973, Hennies 1974, Schmidt et al. 1974, Schwenn et al. 1976, Schwenn und Trebst 1976). Während Schmidt et al. für Chlorella zwei nebeneinander existierende Reduktionsprozesse postulieren, einen für gebundenes Sulfit (Thiosulfonatreduktase) und einen zweiten für freies Sulfit, welches in Gegenwart aktiver Thiole entsteht (Sulfitreduktase), diskutieren Schwenn und Trebst die Möglichkeit, daß die Sulfitreduktase eine Untereinheit eines größeren Enzymkomplexes ist, der in vivo gebundenes Sulfit reduziert.

Wie im vorangehenden Kapitel erläutert, wurde der größte Teil der Sulfitreduktase-Aktivität in einer Partikel-Präparation gefunden, aus der sie durch Solubilisieren freigesetzt werden konnte. Dabei handelte es sich um die aus der Literatur

bekannte "kleine" Sulfitreduktase. Urlaub fand in einer Partikel-Präparation von Catharanthus-Gewebe eine Aktivität, die von APS ausgehend unter Zusatz von O-acetylserin-Sulfhydrylase und OAS Cystein bildete. Durch Dialyse, Einfrieren oder Stehenlassen der Membranpartikel in hypotonischem Puffer bei Raumtemperatur nahm die APS-reduzierende Aktivität ab, und in gleichem Maße stieg die Aktivität einer zuvor nicht meßbaren Ferredoxin-abhängigen Sulfitreduktase (Urlaub und Jankowski 1982, im Druck).

In einer Partikel-Präparation der hier verwendeten S-heterotroph im Licht gezogenen Catharanthus-Kulturen wurde diese Adenylylsulfat-reduzierende Aktivität sowohl mit APS als auch mit PAPS als Substrat ebenfalls gefunden (Gl.I) und mit der Sulfitreduktase-Aktivität (Gl.II) in ihrer Entwicklung während des Kulturzeitraumes verglichen.

$$\text{(I)}\quad \text{(P)APS} \longrightarrow RS\text{-}SO_3^- \longrightarrow RS\text{-}S^- \xrightarrow{\text{OASS}} \text{Cys}$$

$$\text{(II)}\quad SO_3^{2-} \longrightarrow S^{2-} \xrightarrow{\text{OASS}} \text{Cys}$$

Der parallele Verlauf beider Enzymaktivitäten (siehe Abb.27) ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß die Sulfitreduktase-Aktivität zur gleichen Zeit entsteht wie die (P)APS-reduzierende Aktivität. Hierin wird eine Unterstützung der Hypothese gesehen, daß die Sulfitreduktase Teil eines partikulären Enzymkomplexes ist, der die gesamte Sequenz ausgehend von APS oder PAPS bis zum $[S^{2-}]$ einschließt. Man kann deshalb vermuten, daß die aus höheren Pflanzen bislang isolierte Sulfitreduktase nur noch den strukturellen Kern des in vivo die Reduktion katalysierenden Enzymkomplexes darstellt.

In partikulären Extrakten, die (P)APS-reduzierende Aktivität enthielten, war eine APS-Sulfotransferase-Aktivität nicht nachweisbar. Dieser Befund stimmt überein mit den Ergebnissen von Urlaub, der in gereinigten Partikeln die Einzelaktivitäten (S-Sulfotransferase, Thiosulfonatreduktase, Disulfidreduktase, Sulfitreduktase und FNR) erst nach dem Verlust der Aktivität des APS-reduzierenden Enzymkomplexes fand (Urlaub und Jankowski 1982, im Druck). Die funktionelle Einheit dieses Enzymkomplexes

scheint durch die üblichen Extraktionsmethoden in ihre einzelnen Komponenten zu zerfallen, wobei zumindest der die Reduktion katalysierende Teil offenbar seine Substratspezifität ändert und als Sulfitreduktase in der löslichen Fraktion nachweisbar ist.

Die APS-reduzierende Aktivität war in Gegenwart von GSH 4fach stimulierbar. GSH führte in einem vergleichbaren System mit Chlorella-Extrakt zur Bildung von S-Sulfoglutathion (Gl.IIa) und Sulfit (Gl.IIb) (Schmidt 1973, Abrams und Schiff 1973):

$$\text{(I)}\quad \text{APS} \xrightarrow{\text{ohne Thiol}} \text{RS-SO}_3^- \qquad \text{(Transfer auf einen internen unbekannten Carrier)}$$

$$\text{(IIa)}\quad \text{APS} + \text{GSH} \longrightarrow \text{GS-SO}_3^-$$

$$\text{(IIb)}\quad \text{GS-SO}_3^- + \text{GSH} \longrightarrow \text{GS-SG} + \text{SO}_3^{2-}.$$

Wäre die gesteigerte Umsatzrate auf eine Sulfitreduktase zurückzuführen, so hätte auch in Gegenwart von DTE diese Aktivitätszunahme auftreten sollen, da DTE ausschließlich zur Bildung von Sulfit führt (Abrams und Schiff 1973):

$$\text{APS} \xrightarrow{\text{DTE}} \text{SO}_3^{2-}.$$

Dies war jedoch nicht der Fall. Es ist daher anzunehmen, daß S-Sulfoglutathion hierbei die ausschlaggebende Rolle spielt. Da zwischen S-Sulfoglutathion und dem unbekannten internen Carrier ein Austausch des Sulfits erfolgen kann(Schmidt 1973)

$$\text{GS-SO}_3^- + \text{RSH} \rightleftharpoons \text{RS-SO}_3^- + \text{GSH},$$

ist es denkbar, daß Glutathion bei dem Transfer des Sulfits auf seinen physiologischen Carrier als Vermittler fungiert und auf diese Weise die Umsatzrate der APS-reduzierenden Aktivität erhöht. Mit der Vorstellung von einem Enzymkomplex in den Partikeln, der ausgehend von (P)APS die Reduktion des Schwefels

bis zum $[S^{2-}]$ ohne meßbare Einzelaktivitäten wie etwa Thiosulfonatreduktase oder S-Sulfoglutathionreduktase (Urlaub und Jankowski 1982, im Druck) katalysiert, ist die Annahme vereinbar, daß nicht GS-SO_3^- reduziert wird, sondern daß das Sulfit zuvor auf den internen Akzeptor übertragen werden muß.

Der pflanzlichen S-Sulfotransferase wird eine Spezifität für APS zugeschrieben (Schmidt et al. 1974, Schmidt 1976, Schürmann und Brunold 1980). Demzufolge sollte PAPS als Substrat für die Adenylylsulfat-reduzierende Aktivität nicht verwendet werden. Die eigenen Versuche mit Partikel-Präparationen aus Catharanthus- Kulturen zeigten jedoch eine 4fach höhere PAPS-reduzierende Aktivität im Vergleich zur APS-reduzierenden Aktivität in Abwesenheit von GSH. Man könnte vermuten, daß PAPS durch eine 3'-Nucleotidase zu APS abgebaut wird (Sawhney und Nicholas 1976):

$$\text{PAPS} \longrightarrow \text{APS} + P_i \ .$$

Die vergleichsweise höhere Aktivität mit PAPS als Substrat wäre dann eventuell darauf zurückzuführen, daß PAPS wegen einer 5'-Nucleotidase, welche APS zu Sulfat und AMP abbaut (Sawhney und Nicholas 1976, Tsang und Schiff 1976c),

$$\text{APS} \longrightarrow SO_4^{2-} + \text{AMP}$$

in nur partiell gereinigten Extrakten stabiler ist als APS. Unter diesen Bedingungen müßte die "PAPS"-reduzierende Aktivität allerdings auch die mit APS als Substrat gefundene Umsatzsteigerung in Gegenwart von GSH zeigen. Das Thiol beeinflußte die Reduktionsreaktion mit PAPS als Substrat jedoch nicht. Es ist daher unwahrscheinlich, daß mit der PAPS-reduzierenden Aktivität in Wirklichkeit eine APS-reduzierende Aktivität gemessen wurde.

Zwei weitere Interpretationsmöglichkeiten sind denkbar: Entweder ist die S-Sulfotransferase in Catharanthus nicht spezifisch für APS, sondern verwendet auch PAPS als Substrat, wobei der Transfer des Sulfits auf den physiologischen Carrier

möglicherweise leichter erfolgt als von APS ausgehend, so daß GSH keine Mittlerfunktion zu übernehmen brauchte:

$$PAPS \xrightarrow{+/- \text{ GSH}} RS\text{-}SO_3^- \quad .$$

Oder aber in Pflanzen existiert neben der APS-Sulfotransferase eine Enzymaktivität ähnlich der mikrobiellen Thioredoxin-abhängigen und für PAPS spezifischen S-Sulfotransferase (Tsang und Schiff 1975, Dreyfuss und Monty 1963):

$$PAPS \xrightarrow{\text{Thioredoxin}} RS\text{-}SO_3^- \quad .$$

In Gegenwart von Thiolen sollte hierbei jedoch Sulfit entstehen (Tsang und Schiff 1976b):

$$PAPS \xrightarrow[\text{Thiole}]{\text{Thioredoxin}} SO_3^{2-} \quad ,$$

so daß in diesem System nur eine Sulfitreduktase-, nicht aber die PAPS-reduzierende Aktivität gemessen würde.

3.2. Regulation der assimilatorischen Sulfatreduktion und und Verknüpfung mit der Nitratassimilation in Zellkulturen von Catharanthus roseus

Den Regulationsprinzipien bei Mikroorganismen zufolge werden die Enzyme einer Biosynthesekette nicht gebildet, wenn das betreffende Endprodukt in der Nährlösung vorliegt. Unter diesem Aspekt wurden pflanzliche Zellkulturen (Catharanthus roseus) auf Sulfat oder auf reduziertem Schwefel gezogen* und die Aktivitä-

* Der als Na_2S dem Nährmedium zugesetzte Schwefel lag nach Autoklavieren elementar in kolloidaler Lösung vor (siehe Material und Methoden). Das Problem der Permeation von S^0-Schwefel in die Zellen scheint bei Bakterien durch eine GSH-abhängige nicht-enzymatische Reduktion zu S^{2-} an der Zelloberfläche gelöst zu werden (Doelle 1975). Von Tabakkulturen ist bekannt, daß sie große Mengen an GSH ins Medium abgeben können (Bergmann und Rennenberg 1978). Es ist daher denkbar, daß auch in pflanzlichen Kulturen S^0-Moleküle, die sich in der Nähe der Zelloberfläche befinden, zu S^{2-} reduziert werden und in dieser Form die Zellmembran passieren.

ten dreier Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion (ATP-Sulfurylase, Sulfitreduktase/(P)APS-reduzierende Aktivität und OASS) gemessen. Da Sulfat- und Nitratassimilation in struktureller und funktioneller Hinsicht große Ähnlichkeiten aufweisen und über ihre Endprodukte als gemeinsame Vorläufer unter anderem der Proteinbiosynthese in engem Zusammenhang stehen, wurde gleichzeitig der Einfluß unterschiedlicher Schwefelquellen auf die Stickstoff-assimilierenden Enzyme (NAR, NIR, Gln-Syn., GOGAT und Glu-DH) untersucht.

3.2.1. Regulation der Sulfataktivierung

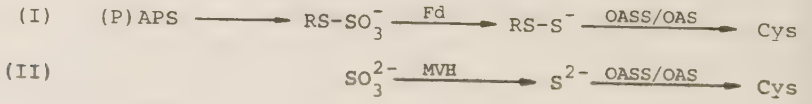
Die ATP-Sulfurylase lag in Kulturen, die auf reduziertem Schwefel gezogen worden waren, bis zum Ende der linearen Wachstumsphase reprimiert vor, verglichen mit der Aktivität in S-autotrophen Zellen (siehe Abb.25). Daraus läßt sich schließen, daß die ATP-Sulfurylase durch ein Endprodukt der assimilatorischen Sulfatreduktion, vermutlich Cystein, reprimiert wurde. Der Aktivitätsanstieg zu Beginn der linearen Wachstumsphase ist möglicherweise auf ein "Ausdünnen" des die Repression auslösenden Metaboliten während des Wachstums zurückzuführen. ATP-Sulfurylase und OASS waren negativ korreliert in Bezug auf den Grad ihrer Derepression zu Beginn des Zellwachstums: Einer stark dereprimierten OASS entsprach eine nur schwach dereprimierte ATP-Sulfurylase in S-heterotrophen Kulturen; das umgekehrte Verhältnis lag in S-autotrophen Kulturen vor. Dieser Zusammenhang kann als ein guter Hinweis dafür gewertet werden, daß die ATP-Sulfurylase durch Cystein, das Endprodukt der Sulfatassimilation reprimiert wird.

In Mikroorganismen ist dieses Regulationsprinzip für die ATP-Sulfurylase gefunden worden; regulatorisch wirksame Metaboliten sind hier Cystein und/oder Methionin (Wheldrake und Pasternak 1965, Ellis et al. 1964, Wheldrake 1967, Cherest et al. 1973, Tweedy und Segel 1971, Paszewsky und Grabski 1974). In höheren Pflanzen ist die Regulation der ATP-Sulfurylase weniger gut untersucht. 1969 schloß Ellis aus Versuchen mit ganzen Pflanzen, die auf Cystein-, Methionin- oder GSH-halti-

gen Nährlösungen gezogen wurden, daß dieses Enzym nicht durch ein Endprodukt der Sulfatreduktion reprimiert wird (Ellis 1969). Reuveny und Filner fanden dagegen in Nicotiana tabacum eine Repression der ATP-Sulfurylase sowohl durch Cystein als auch durch Sulfat (Reuveny und Filner 1977). Die Tatsache, daß hier bei Wachstum der Kulturen auf den beiden verschiedenen Schwefelquellen kein deutlicher Unterschied in der enzymatischen Aktivität erkennbar war, ist vermutlich auf die sehr niedrigen Stickstoff- und Schwefel-Konzentrationen im Nährmedium zurückzuführen, so daß sich die Zellen sehr früh in einem Mangelzustand befanden. Schwenn et al. (1979) testeten die Aktivität der ATP-Sulfurylase in Zellkulturen von Catharanthus bei Wachstum auf Sulfat und auf Cystein. Der Aktivitätsverlauf bei S-autotropher Anzucht und in Gegenwart von 1 mM Cystein entsprach vom 1. bis zum 9. Kulturtag fast völlig den vorliegenden Ergebnissen. Dies stützt die Vermutung, daß Cystein der regulierende Metabolit für die ATP-Sulfurylase ist.

3.2.2. Regulation der Reduktion

Im Kapitel über die biochemische und physiologische Relevanz der Sulfitreduktase wurde ausgeführt, daß diese mit großer Wahrscheinlichkeit Teil des (P)APS-reduzierenden Enzymkomplexes ist. Die Aktivität der Reduktion wurde bei den Versuchen zur Regulation als Sulfitreduktase gemessen, d.h. es wurde nur die Schlüsselreaktion (Gl.II) des in vivo aktiven Enzymkomplexes (Gl.I) betrachtet.



Wenngleich hierbei die Transferase-Reaktion außer acht gelassen wurde, erschien es dennoch zulässig, das Muster der enzymatischen Aktivität der Sulfitreduktase als repräsentativ für die (P)APS-reduzierende Aktivität anzusehen, da ja beide Enzymaktivitäten weitgehend parallel verliefen (siehe Abb.27). Die

Regulation des Transfers und möglicherweise der Produktion von am Enzymkomplex beteiligten Cofaktoren überlagern die Reduktion demnach nicht. Daraus läßt sich schließen, daß die Teilreaktionen der (P)APS-reduzierenden Aktivität entweder einheitlich reguliert werden, und zwar nach dem Muster der Sulfitreduktase oder daß sie einer differenzierten Regulation unterliegen, dabei aber für die Reduktion nicht limitierend sind. Ein Vergleich der Umsatzraten von Sulfitreduktase und (P)APS-reduzierender Aktivität legt die erstgenannte Möglichkeit der Regulation des gesamten Enzymkomplexes nahe, da bei parallelem Aktivitätsverlauf die (P)APS-reduzierende Aktivität niedriger lag als die Sulfitreduktase-Aktivität. Einschränkend muß erwähnt werden, daß dieser Aktivitätsunterschied auch auf eine nicht optimale Extraktion der Membran-gebundenen (P)APS-reduzierenden Aktivität zurückzuführen sein könnte.

Die Aktivität der Sulfitreduktase lag in S-heterotroph gezogenen Zellen über den gesamten Kulturzeitraum höher als in S-autotrophen Zellen (siehe Abb.26). Dieser unerwartete Verlauf der enzymatischen Aktivität entspricht nicht dem von Mikroorganismen bekannten Prinzip einer Repression des Enzyms in Gegenwart des Endproduktes der Reaktionsfolge. Die pflanzliche Sulfitreduktion scheint demnach nicht durch Sulfid (oder S°-Schwefel) bzw. Cystein reprimiert zu werden. Die Phase des Aktivitätsabfalls der Sulfitreduktase zu Beginn der Generationszeit in S-autotrophen und S-heterotrophen Kulturen war korreliert mit dem Anstieg der ATP-Sulfurylase-Aktivität: Entsprechend der nur schwach dereprimierten ATP-Sulfurylase in S-heterotrophen Zellen war die Sulfitreduktase vergleichsweise weniger stark reprimiert; das umgekehrte Verhältnis lag in S-autotrophen Zellen vor. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, daß möglicherweise ein Folgeprodukt der ATP-Sulfurylase (APS oder PAPS) die Sulfitreduktase (oder umfassender die (P)APS-reduzierende Aktivität) negativ kontrolliert. Unter diesen Bedingungen würde in Gegenwart von genügend aktiviertem Sulfat die Reduktion so weit herabgesetzt, daß der Bedarf an reduziertem Schwefel gerade gedeckt ist; bei verminderter Konzentration an Adenylylsulfat stiege dagegen die Aktivität der an der Reduktion beteiligten Enzyme an, um ausreichend Sulfid für

die Cystein-Biosynthese liefern zu können. Das zur Bildung von APS und PAPS benötigte Sulfat konnte die Zelle bei S-heterotropher Anzucht zum einen aus dem Abbau von Cystein durch ein den bakteriellen Cystein-Desulfhydrasen ähnliches Enzym (Harrington und Smith 1980, Smith 1980) erhalten, zum anderen in Form von Verunreinigungen der Nährsalze (in frischem S-heterotrophen Nährmedium wurde eine Sulfat-Konzentration von 20 nmolar gefunden; siehe Material und Methoden).

Eine negative Kontrolle der Sulfitreduktase bzw. der (P)APS-reduzierenden Aktivität durch aktiviertes Sulfat bedeutet, daß die an der Reduktion beteiligten Enzyme die Sulfatassimilation limitieren. Hierfür sprechen die zur ATP-Sulfurylase und OASS völlig antagonistisch verlaufende Aktivität der Sulfitreduktase bzw. (P)APS-reduzierende Aktivität und ihre vergleichsweise niedrigen Umsatzraten.

Als ein weiterer, die Aktivität der Sulfitreduktion beeinflussender Faktor muß das Cystein-bildende System (OAS/OASS) in Betracht gezogen werden. Wie im Kapitel über die Aktivität der Sulfitreduktase in vitro bereits diskutiert, läßt sich die gesteigerte Umsatzrate der Sulfitreduktion in Gegenwart des Cystein-bildenden Systems wahrscheinlich darauf zurückführen, daß das Endprodukt (Sulfid) aus dem Reaktionsgleichgewicht abgezogen wird. Der zur maximalen Stimulierung der Sulfitreduktase-Aktivität notwendige 800- bis 1000fache Aktivitätsüberschuß an O-acetylserin-Sulfhydrylase war während der in vivo-Experimente in den Zellkulturen stets vorhanden, so daß eine Regulation der Sulfitreduktion über die Aktivität der OASS nicht wahrscheinlich ist. Die Versuchsergebnisse erlauben keine Aussage über den Gehalt an O-acetylserin in den Zellen; es ist aber anzunehmen, daß dieser über den Kulturzeitraum variiert und auf diese Weise die Umsatzrate von Sulfitschwefel beeinflußt.

Über eine Regulation der pflanzlichen Sulfitreduktase oder Thiosulfonatreduktase in vivo ist in der Literatur nichts bekannt. Die S-Sulfotransferase wurde mehrfach auf ihre Regulation hin untersucht (Brunold und Schmidt 1978, Jenni und Brunold 1980, Arb und Brunold 1980, Brunold et al. 1981, Schwenn et al. 1979). Die Autoren fanden eine Repression der DTE- und der NADPH-abhängigen Enzymaktivitäten durch Cystein. Die Um-

satzraten der Transferase lagen im Bereich der hier für die Sulfitreduktase gefundenen Aktivitäten. Brunold folgerte aus diesen Ergebnissen, daß die Repression der Transferase als Mechanismus zur Verringerung der energieaufwendigen Reduktion angesehen werden kann (Brunold et al. 1981). Die eigenen Befunde lassen es dagegen als wahrscheinlich erscheinen, daß Transfer und Reduktion in gleicher Weise reguliert werden, was nicht ausschließt, daß der Transfer der limitierende Schritt der Sulfatassimilation in Pflanzen ist.

3.2.3. Regulation der Cystein-Biosynthese

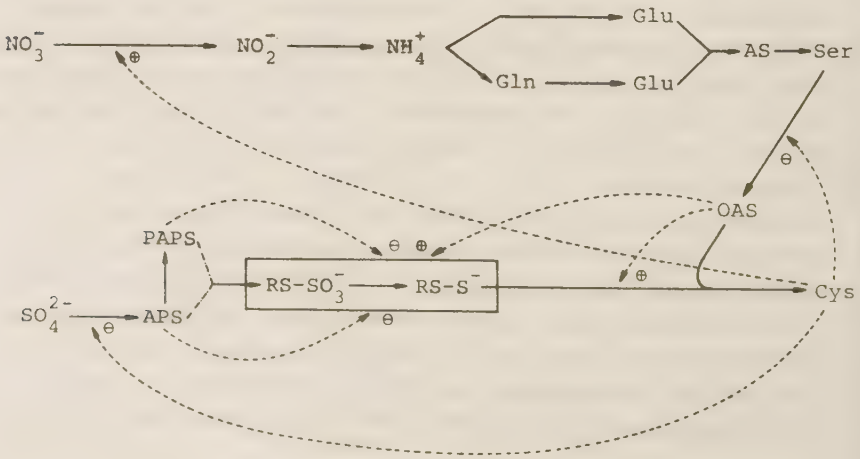
Die Aktivitäten der OASS nahmen in S-autotrophen und S-heterotrophen Kulturen einen vergleichbaren Verlauf; allerdings war das Enzym bei Anzucht der Zellen auf S°-Schwefel zu Beginn der linearen Wachstumsphase wesentlich stärker dereprimiert (siehe Abb.28). Unter den Bedingungen einer S-heterotrophen Anzucht der Kulturen sollte Cystein sehr rasch gebildet werden, da der limitierende Reduktionsschritt hier keine Rolle spielt. Infolgedessen könnte Cystein über die Nitratassimilation eine verstärkte Synthese von Aminosäuren hervorrufen (bei der Untersuchung der Regulation der Nitratreduktase durch Aminosäuren in Tabakkulturen fand Filner eine Derepression dieses Enyzms durch Cystein; Filner 1966). Eine dieser Aminosäuren (Serin) ist der Vorläufer eines der beiden Substrate der OASS, des O-acetylserins, welches möglicherweise die starke Derepression der OASS verursacht. Von Mikroorganismen ist bekannt, daß O-acetylserin die OASS (neben den übrigen Enzymen der Sulfatassimilation) stimuliert (Jones-Mortimer et al. 1968, Kredich 1971).

Der anschließende Rückgang der OASS-Aktivität, der in S-heterotrophen Kulturen besonders steil erfolgte, läßt sich wahrscheinlich auf die repressive Wirkung von Cystein zurückführen. In Bakterien fand man eine indirekte Einflußnahme von Cystein auf die OASS (und die übrigen Enzyme der Sulfatassimilation) über eine Hemmung der Serin-Transacetylase (Jones-Mortimer et al. 1968, Kredich 1971). Der dadurch bedingte Man-

gel an OAS führte zu einer Aktivitätsabnahme der OASS. Smith fand in Tabakkulturen, daß die Menge an OAS mit der Aktivität der O-acetylserin-Sulfhydrylase korreliert war; dagegen beeinflußte die Versorgung der Kulturen mit Schwefel die OASS-Aktivität nicht (Smith 1980).

Auf einen Zusammenhang mit dem Stickstoff-Stoffwechsel weist der in beiden Zellkulturen fast parallel zur OASS verlaufende Proteingehalt hin. Bei einem Vergleich der OASS mit den Enzymen der Stickstoffassimilation in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Kulturen zeigte sich, daß in Zellen, die auf reduziertem Schwefel gewachsen waren, die Aktivitäten von Nitratreduktase, Nitritreduktase und Gln-Synthetase ebenso wie die der OASS erheblich höher lagen (siehe Abb.31a,b). Das Signal für den Aktivitätsanstieg der Enzyme der Nitratassimilation ist, wie oben diskutiert, möglicherweise Cystein.

Zusammenfassend lassen sich die in den vorliegenden Experimenten gefundenen Muster der Aktivitäten der Sulfat-assimilierenden Enzyme in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellen folgendermaßen interpretieren: Die O-acetylserin-Sulfhydrylase scheint positiv kontrolliert zu werden durch OAS, ein Folgeprodukt der Stickstoffassimilation. Das hierdurch verstärkt gebildete Cystein besitzt einerseits einen positiven Effekt auf die Nitratreduktase, was letztlich zu erhöhter Produktion von OAS



führt, andererseits übt es offenbar einen negativen Einfluß auf die ATP-Sulfurylase und auf die Serin-Transacetylase aus, wodurch die Synthese von OAS und schließlich auch von Cystein selbst gedrosselt wird. Die Sulfitreduktase bzw. die (P)APS-reduzierende Aktivität unterliegt möglicherweise einer negativen Kontrolle durch aktiviertes Sulfat (APS oder PAPS). Die an der Produktion beteiligten Enzyme würden damit die Sulfatassimilation limitieren. Darüberhinaus ist ein die Umsatzrate von Sulfit-Schwefel stimulierender Einfluß des Cystein-bildenden Systems (OASS/OAS) in Betracht zu ziehen.

3.2.4. Verknüpfung von Sulfat- und Nitratassimilation

Die Enzyme der Nitratreduktion, Nitrat- und Nitritreduktase, sowie die Gln-Synthetase zeigten bei Wachstum der Zellkulturen auf reduziertem Schwefel eine vergleichsweise starke Aktivitätszunahme (siehe Abb.31a,b), die, wie im vorangehenden Kapitel erläutert, möglicherweise auf den stimulierenden Einfluß von Cystein auf die Nitratreduktase zurückgeführt werden kann (Filner 1966). Von der Nitritreduktase ist bekannt, daß sie unter anderem durch Nitrit, das Produkt der ersten Reduktionsreaktion, induziert werden kann (Chroboczek-Kelker und Filner 1971, Stewart 1972). Die erhöhten Enzymaktivitäten kamen in einem gegenüber S-autotroph gezogenen Kulturen stark gesteigerten Gehalt an löslichem Protein zum Ausdruck.

Die Aktivitäten der NADH- und der NADPH-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase verliefen in S-autotrophen Zellen antagonistisch zur Glutamin-Synthetase-Aktivität und zum Gehalt der Zellen an löslichem Protein (siehe Abb.32a,b). Demnach übernahm während der Phase gesteigerter Proteinbiosynthese die Gln-Synthetase verstärkt die Assimilation von Ammonium-Ionen. In S-heterotroph gezogenen Kulturen lag die Aktivität beider Glu-Dehydrogenasen niedriger als bei Wachstum der Zellen auf Sulfat*; demgegenüber

* Die NADPH-abhängige Glu-DH-Aktivität war um 60% und die NADH-abhängige um 20% gegenüber den Enzymen in S-autotroph gezogenen Kulturen erniedrigt. In der Literatur wurde die für NADH spezifische Enzymaktivität von einigen Autoren den Mitochondrien zugeordnet (Bone 1959, Ritenour et al. 1967), die für NADPH spezifische Glu-DH den Chloroplasten

war die Gln-Synthetase-Aktivität beträchtlich erhöht (siehe Abb.32a,b). Die enzymatischen Aktivitäten verliefen hier zunächst nicht antagonistisch. Der anfängliche leichte Aktivitätsanstieg der Glu-Dehydrogenasen synchron mit der Gln-Synthetase läßt sich möglicherweise auf eine erhöhte Konzentration an Ammonium-Ionen zurückführen, die durch die jeweils um das Doppelte gestiegene Nitrat- und Nitritreduktase-Aktivität in S-heterotrophen Kulturen produziert wurde. Die stimulierende Wirkung von Ammonium-Ionen in hoher Konzentration auf die Aktivität der Glu-Dehydrogenase wurde von mehreren Autoren gezeigt (Kanamori et al. 1972, Shepard und Thurman 1973, Ratajczak et al. 1981).

Die Glu-Dehydrogenasen scheinen demnach zwei verschiedenen Einflüssen zu unterliegen: einem repressiven durch die Gln-Synthetase (aus Versuchen mit Bakterien wurde geschlossen, daß die Glu-Dehydrogenase durch die Gln-Synthetase reprimiert wird; Brenchley et al. 1973) und einem stimulierenden durch eine erhöhte Konzentration an Ammonium-Ionen. Beide Einflüsse kamen verstärkt in Kulturen zum Ausdruck, die auf reduziertem Schwefel gewachsen waren, und zwar wahrscheinlich deshalb, weil die Nitratassimilation unter diesen Anzuchtsbedingungen gesteigert wurde.

Auf die GOGAT wirkte sich die Versorgung der Zellen mit unterschiedlichen Schwefelquellen scheinbar ebenfalls indirekt über eine Veränderung der Konzentration an Ammonium-Ionen aus, allerdings in umgekehrter Weise wie bei den Glu-Dehydrogenasen (siehe Abb.32a,b): In S-heterotrophen Kulturen, in denen die Glu-Dehydrogenase-Aktivitäten offenbar wegen der erhöhten Konzentration an NH_4^+ anfangs dereprimiert blieben, lag die GOGAT reprimiert vor. Die Phase ihrer Derepression verschob sich gegenüber S-autotroph gezogenen Kulturen von der ersten in

(Leech und Kirk 1968), obwohl die Pyridinnucleotid-Spezifität nicht eindeutig geklärt ist. Die unterschiedliche Reaktion der Enzymaktivitäten auf eine Änderung in der Schwefelversorgung (S° statt SO_4^{2-}) und, als Folge davon, auf einen veränderten Stickstoffhaushalt läßt darauf schließen, daß es sich hierbei tatsächlich um zwei verschiedene Enzyme handelt.

die zweite Hälfte der Generationszeit, während der die Glu-Dehydrogenasen bereits reprimiert waren. In Lemna wurde eine Repression der GOGAT bei erhöhter Konzentration an Ammonium-Ionen und eine Derepression bei Versorgung der Pflanzen mit limitierten Mengen an NH_4^+ gefunden (Rhodes et al. 1976).

Sämtliche Enzyme der assimilatorischen Nitratreduktion zeigten bei einem veränderten Schwefel-Haushalt der Zellen Veränderungen im Muster ihrer Aktivität. Unter den vorliegenden Anzuchtsbedingungen der Kulturen schien reduzierter Schwefel der limitierende Faktor für die Stickstoffassimilation und die Proteinbiosynthese zu sein; denn bei Wachstum der Zellen auf S°-Schwefel erfolgte zunächst eine vergleichsweise starke Aktivitätszunahme der primär Nitrat-assimilierenden Enzyme Nitrat- und Nitritreduktase sowie der Gln-Synthetase; außerdem veränderte sich das Enzymmuster der Glu-Dehydrogenase und der GOGAT, wahrscheinlich infolge einer erhöhten Konzentration an Ammonium-Ionen, produziert durch die Enzyme der Reduktion. Aus diesen Veränderungen der enzymatischen Aktivitäten resultierte dann ein gegenüber S-autotroph gezogenen Kulturen um die Hälfte gesteigerter Proteingehalt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Sulfat- und Nitratassimilation über Produkte des jeweils anderen Biosyntheseweges miteinander in Verbindung stehen. Hierbei kontrolliert nicht, wie von Mikroorganismen bekannt, ein Metabolit die gesamte Enzymsequenz eines Biosyntheseweges; vielmehr werden offenbar einzelne Enzyme gezielt reguliert, welche dann ihrerseits Signale an Enzyme des eigenen oder des anderen Syntheseweges weitergeben. Sulfat- und Nitratassimilation in Zellkulturen von Catharanthus scheinen durch OAS und Cystein koordiniert zu werden.

4. Zusammenfassung

Die Bedeutung der Sulfitreduktase in Pflanzen ist bisher ungeklärt, da hier Sulfit und Sulfid als Intermediate der assimilatorischen Sulfatreduktion nicht in "freier" Form, sondern gebunden an ein niedermolekulares Carrierprotein gefunden wurden. Aus diesem Grunde galt bisher eine Thiosulfonatreduktase als das physiologisch relevante Enzym. Die Funktion der Sulfitreduktase wurde unterschiedlich interpretiert: Wegen ihrer großen funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit mit der Nitritreduktase und ihrer geringen Spezifität für Sulfit hielt man es für möglich, daß es sich bei der Sulfitreduktion um eine Nebenreaktion der Nitritreduktase handeln könnte. Ferner wurde vorgeschlagen, daß die Sulfitreduktase neben der Thiosulfonatreduktase einen alternativen Reduktionsschritt katalysiert oder daß sie Teil eines Enzymkomplexes ist, aus dem sie bei der Extraktion freigesetzt wird.

Unter Berücksichtigung der von Mikroorganismen bekannten Prinzipien der Enzymregulation, wonach ein Enzym durch das Endprodukt der betreffenden Biosynthesekette reprimiert wird, sollte versucht werden, in Kulturen dedifferenzierter pflanzlicher Zellen einer Repression analoge Änderungen der assimilatorischen Sulfatreduktion und eventuell auch der Nitratreduktion herbeizuführen. Dadurch verursachte Unterschiede im Muster enzymatischer Aktivitäten lassen Rückschlüsse auf die Beteiligung der Enzyme an den entsprechenden Stoffwechselwegen zu. Es wurde erwartet, mit dieser Methode die Sulfitreduktase gegen die Nitritreduktase abgrenzen und zur Thiosulfonatreduktase bzw. zum APS-reduzierenden Enzymkomplex in Beziehung setzen zu können. Außerdem sollten auf diese Weise sowohl die Regulation der einzelnen an der Sulfat- und Nitratassimilation beteiligten Enzyme als auch eventuelle Verknüpfungen zwischen den beiden funktionell und strukturell sehr ähnlichen Assimilationswegen untersucht werden.

Die methodischen Voraussetzungen zur Untersuchung der Regulation von Enzymen, nämlich ein Testsystem, das optimale Bedingungen für die Aktivitätsmessung schafft und ein Verfahren zur möglichst vollständigen, schonenden Extraktion, wurden für

die drei maßgeblichen enzymatischen Aktivitäten Sulfitreduktase, (P)APS-reduzierende Aktivität und Nitritreduktase geschaffen. Außerdem gelang es, S-autotroph gezogene Zellsuspensionskulturen von Catharanthus roseus auf S-heterotrophe Anzuchtsbedingungen zu adaptieren, um durch Versorgung der Zellen mit reduziertem Schwefel die Enzyme der Sulfatassimilation und möglicherweise auch der Nitratassimilation zu beeinflussen.

In vitro-Versuche mit der Sulfitreduktase aus Catharanthus-Gewebe zeigten, daß es sich hierbei um das aus der Literatur bekannte "kleine" Enzym handelte, welches Methylviologen-abhängig Sulfit zu Sulfid reduzierte mit der erwarteten Stöchiometrie von 6:1. Es stellte sich heraus, daß diese Sulfitreduktase ursprünglich ein Membran-gebundenes Enzym ist. Offenbar kann sie in zwei verschiedenen Formen existieren, deren eine die Reaktion (möglicherweise die Dissoziation in Enzym und Produkt) blockiert. Aus der inaktiven Form ließ sie sich durch Vorinkubation mit einer spezifischen Menge ihres Substrats in die aktive Form überführen. Durch Ankopplung des Cystein-bildenden Systems (O-acetylserin-Sulfhydrylase und OAS) konnte die Umsatzrate der Sulfitreduktase gesteigert werden. Vermutlich wurde die Reaktion durch Abfangen des Produktes (Sulfid) "gezogen". Die Stöchiometrie der Methylviologen-abhängigen Sulfitreduktion von 6:1 ergab sich bei dieser mit O-acetylserin-Sulfhydrylase und OAS gekoppelten Reaktion, wenn die hierbei entstehenden Endprodukte Cystein und Sulfid addiert wurden.

Ferner konnte gezeigt werden, daß Sulfit- und Nitritreduktase auch in höheren Pflanzen wie in Mikroorganismen zwei verschiedene Enzyme mit unterschiedlicher Regulation sind.

Die Sulfitreduktase stellt vermutlich den strukturellen Kern eines Membran-gebundenen Enzymkomplexes dar, der die Reaktionssequenz ausgehend von aktiviertem Sulfat (APS oder PAPS) bis zum Sulfid ($[S^{2-}]$) umfaßt und durch die üblichen Extraktionsmethoden in seine einzelnen Komponenten zerfällt.

Die Reduktion von Sulfit-Schwefel in Pflanzen scheint nicht den von Mikroorganismen bekannten Regulationsprozessen zu unterliegen, wonach ein Enzym durch das Endprodukt der betreffenden Biosynthesekette reprimiert wird. Eine vergleichende Betrach-

tung der enzymatischen Aktivitäten der Sulfitreduktase (repräsentativ für den in vivo die Reduktion katalysierenden Enzymkomplex) in S-autotroph und S-heterotroph gezogenen Zellkulturen im Zusammenhang mit ATP-Sulfurylase und O-acetylserin-Sulfhydrylase läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Reduktion in höheren Pflanzen durch ein Folgeprodukt der ATP-Sulfurylase (APS oder PAPS) negativ kontrolliert wird und damit den regulierenden Schritt der Sulfatassimilation darstellt. Darüberhinaus ist ein die Umsatzrate von Sulfit-Schwefel stimulierender Einfluß des Cystein-bildenden Systems (OASS/OAS) wahrscheinlich. Die ATP-Sulfurylase wird durch ein Endprodukt der Sulfatassimilation, vermutlich Cystein, reprimiert. Die OASS scheint durch ihr Substrat OAS positiv kontrolliert zu werden.

Sulfat- und Nitratassimilation stehen über Produkte des jeweils anderen Reduktionsweges miteinander in Verbindung. Die Versuchsergebnisse lassen Cystein und O-acetylserin als die regulatorisch wirksamen Metaboliten erscheinen.

5. Material und Methoden

5.1. Kulturanzucht

Die hier verwendeten Suspensionskulturen wurden aus einer Stammkultur von Catharanthus roseus gezogen, die auf einem Nährmedium gemäß Linsmeier und Skoog (1965) im Dunkeln wuchs. Um die farblosen Zellen zu begrünen (in grünen Kulturen liegen die Enzymaktivitäten höher), wurde der Saccharosegehalt des Nährmediums schrittweise von 3% (w/v) auf 1,25% gesenkt und die Kulturen einer Lichtstärke von 1700 Lux ausgesetzt. Nach mehreren Adaptionsgenerationen enthielten die Zellen gegen Ende der Kulturzeit etwa 12 µg Chlorophyll/ml Homogenat (Aufarbeitung s.u.). Bei doppelter Lichtstärke gingen die Kulturen zugrunde. Mit abnehmendem Saccharosegehalt stieg der Chlorophyllgehalt an, gleichzeitig verlangsamte sich das Wachstum. Der Saccharosegehalt wurde daher wieder auf 2,25% heraufgesetzt, was zu einer mittleren Generationszeit von 12 Tagen und einem Chlorophyllgehalt von 2-3 µg/ml Homogenat führte. Die Animpfmenge betrug etwa 5 g Gewebe pro 80 ml Medium.

Die Kulturen wurden N-mixotroph gezogen mit 20 mM Ammonium- und 40 mM Nitratstickstoff. S-autotrophe Kulturen wuchsen auf 1,8 mM Sulfat; S-heterotrophe Kulturen wurden durch Umsetzen von S-autotrophem Gewebe auf Sulfid-haltiges Medium und einer mindestens zwei Generationen währenden Adaptionsphase gewonnen. Im S-heterotrophen Medium waren die Sulfat-haltigen Komponenten durch Chlorid-haltige ersetzt; der reduzierte Schwefel wurde in Form von Na_2S (1 mM) eingewogen. Nach Autoklavieren lag der Schwefel nicht mehr als Sulfid vor (der Sulfid-Test nach Siegel, 1965, verlief negativ), sondern als elementarer Schwefel. Der Nachweis hierfür wurde durch eine Behandlung mit Schwefelkohlenstoff erbracht; die gelbliche Trübung des Mediums verschwand danach. Eine weitere Oxidation des Schwefels zum Sulfat erfolgte nicht; die Sulfatbestimmung (Fällung mit $BaCl_2$, Rennenberg und Bergmann 1979) ergab einen Gehalt von 20 nmolar, was auf Verunreinigungen durch Medienbestandteile zurückgeführt wurde.

5.2. Präparation von Enzymextrakten aus Catharanthus-Suspensionskulturen

5.2.1. Präparation einer löslichen und einer partikulären Fraktion

Das Kulturmedium wurde abgenutscht und das Gewebe mit Aufarbeitungspuffer gewaschen. Gewebe [g] und Aufarbeitungspuffer [ml] wurden 1:1 gemischt und im eisgekühlten Waring blender 30 Sekunden lang auf höchster Stufe homogenisiert. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand für weitere 60 Minuten bei 48000 x g zentrifugiert. Der Überstand (S_{48}) wurde über Biogel P4 chromatographiert und zum Test eingesetzt, das Pellet im Aufarbeitungspuffer resuspendiert, für 3 Stunden im Eisbad stehengelassen und dann für 10 Minuten bei 48000 x g abzentrifugiert. Der Überstand hiervon (P_{48}) wurde über Biogel P4 chromatographiert.

Beim Elutionspuffer handelte es sich um 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7. Der Aufarbeitungspuffer enthielt zusätzlich 0,5 mM EDTA und 10 mM MSH.

5.2.2. Präparation von partiell gereinigtem Enzymextrakt mit Ultraschallbehandlung

Das Kulturmedium wurde abgenutscht und das Gewebe mit Aufarbeitungspuffer gewaschen. Gewebe [g] und Aufarbeitungspuffer [ml] wurden 1:1 gemischt und im eisgekühlten Waring blender 30 Sekunden lang auf höchster Stufe homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat zusammen mit der Hälfte des Gewebegewichtes an Glasperlen 4 x 5 Sekunden beschallt (Branson Sonifier B-12, Stufe 7) und der Überstand hiervon über Biogel P4 chromatographiert.

Beim Elutionspuffer handelte es sich um 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7. Der Aufarbeitungspuffer enthielt zusätzlich 0,5 mM EDTA und 10 mM MSH.

5.2.3.1. Präparation des partiell gereinigten Enzymextraktes (Routineaufarbeitung)

Das Kulturmedium wurde abgenutscht und das Gewebe (30 g) mit Aufarbeitungspuffer (100 ml) gewaschen. Gewebe [g] und Aufarbeitungspuffer + 0,001 v/v Triton X-100 [ml] wurden 1:1 gemischt, das halbe Gewebegewicht an Glasperlen hinzugefügt und im eisgekühlten Waring blender 30 Sekunden lang auf höchster Stufe homogenisiert. Zum Solubilisieren blieb das Homogenat für 15 Minuten im Eisbad und wurde dann bei 3000 x g abzentrifugiert. Es folgten Ammoniumsulfat-Fällung des Überstandes (0-75% + 1 mM EDTA, bei pH 6,8, s.u.), Zentrifugation für 10 Minuten bei 48000 x g, Resuspension des Pellets in 2 ml Elutionspuffer, Zentrifugation für 10 Minuten bei 48000 x g und Entsalzung des klaren Überstandes über Biogel P4 (1,2 x 16 cm). Die drei Protein-reichsten Fraktionen wurden vereinigt und zum Test eingesetzt.

Beim Elutionspuffer handelte es sich um 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7 (bei den Versuchen zur Enzymregulation wurde 50 mM Tris/HCl pH 7,7 verwendet, da Phosphat den ATP-Sulfurylase-Test stört).

Der Aufarbeitungspuffer enthielt zusätzlich 0,5 mM EDTA, 1 mM $Na_2S_2O_5$ und 10 mM MSH.

5.2.3.2. Fällung des solubilisierten Extraktes mit Ammoniumsulfat

Bei der im Anschluß an die Solubilisierung durchgeführten Fällung des abzentrifugierten Extraktes mit Ammoniumsulfat wurde die größte Ausbeute an Sulfit- und Nitritreduktase-Aktivität in leicht saurem Milieu erzielt. Der optimale Fällungsbereich lag zwischen 50 und 70%.

a

Versuchsbedingungen	Gesamtaktivität nMole MV_{ox}/Min. x Homogenatvol.	
	Sulfitred.	Nitritred.
ungefällt (Kontrolle)	436,08 (=100%)	1663,20 (=100%)
alkalisch pH 7,8	192,24 (44%)	543,78 (33%)
neutral pH 7,0	202,86 (47%)	785,46 (47%)
sauer pH 6,8	294,84 (68%)	1654,44 (99%)

b

Versuchs-bedingungen	Sulfitreduktase			Nitritreduktase		
	spez.Akt.	Anr.	Ges.Akt.	spez.Akt.	Anr.	Ges.Akt.
ungefällt	14,70	-	2227,2	40,68	-	6169,8
40 - 50 %	10,98	0,7		36,54	0,9	
50 - 60 %	34,98	2,4	2077,2	147,42	3,6	6965,4
60 - 70 %	37,20	2,5		97,80	2,4	

spez. Akt.: nMole MV_{ox}/Min. x mg Protein (spezifische Aktivität)
Ges. Akt.: nMole MV_{ox}/Min. x Homogenatvolumen (Gesamtaktivität)
Anr.: Anreicherungsfaktor

a) optimaler pH-Bereich der Fällung bezüglich Sulfit- und Nitritreduktase-Aktivität
b) optimaler Fraktionierungsbereich der Fällung bezüglich Sulfit- und Nitritreduktase-Aktivität

5.2.3.3. Aufbewahrung des partiell gereinigten Enzymextraktes

Der Enzymextrakt konnte nach partieller Reinigung bei -20°C aufbewahrt werden. Die Aktivitätsminderung betrug nach 10 Tagen für Sulfit- und Nitritreduktase nur 15% (siehe Tab.). Bei den anderen getesteten Aufbewahrungsformen lag dieser Wert für eines der Enzyme oder für beide gleichzeitig deutlich höher. In fast allen Fällen war eine anfängliche Stimulierung zu verzeichnen; lediglich Sorbit minderte die Sulfitreduktase-Aktivität gleich zu Beginn.

Alter Tage	Aktivität nMole MV_{ox}/Min. x mg Prot.					
	Kontrolle bei 4°C	1M KCl bei 4°	20% Sacch. bei 4°	20% Sorbit bei 4°	$(NH_4)_2SO_4$ bei 4°	gefroren bei -20°
	Sulfitreduktase					
0	15,9					
2	19,5	17,7	15,6	12,6	19,5	21,0
6	18,0	15,6	16,5	10,5	20,5	20,4
10	12,0	13,8	10,2	9,9	14,4	18,6
	Nitritreduktase					
0	96,0					
2	120,0	121,8	133,2	122,4	114,0	132,6
6	132,0	145,2	124,8	109,2	148,8	126,0
10	35,4	148,2	91,2	37,8	128,8	117,0

Enzymatische Aktivität von Sulfit- und Nitritreduktase nach Aufbewahrung des partiell gereinigten Enzymextraktes bei 4°C ohne Zusatz, mit 1M KCl, mit 20% Saccharose, mit 20% Sorbit, gefällt mit Ammoniumsulfat/EDTA und gefroren bei -20°C

5.2.4. Präparation der Partikel-Fraktion (Routineaufarbeitung)

Das Kulturmedium wurde abgenutscht und das Gewebe (120 g) mit Aufarbeitungspuffer (200 ml) gewaschen. Gewebe [g] und Aufarbeitungspuffer [ml] wurden 1:1 gemischt und im eisgekühlten Waring blender 40 Sekunden lang bei höchster Stufe homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst für 15 Minuten bei 27000 x g zentrifugiert, der Überstand hiervon ($=S_{27}$) weitere 60 Minuten bei 100 000 x g. Das Pellet der Ultrazentrifugation ($=P_{100}$) wurde in etwa 1 ml Aufarbeitungspuffer resuspendiert und dieser partikuläre Extrakt zum Test eingesetzt.

Beim Aufarbeitungspuffer handelte es sich um 50 mM Tris/HCl pH 7,7, dem 0,1 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$ sowie je 1 µM FMN und FAD zugesetzt waren.

5.3. Testsysteme

5.3.1. Bestimmung der Sulfitreduktase-Aktivität

Das Testsystem zur Messung der Sulfitreduktase-Aktivität wurde nach der Methode von Asada (1967) modifiziert. Der Testansatz mit einem Volumen von 3 ml enthielt komplett: 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7, 0,1 mM EDTA, 40 mM O-acetylserin (neutralisiert), 0,33 mM Methylviologen (davon lagen im Ansatz etwa 50% reduziert vor), 0,75 mM Na_2SO_3 (frisch angesetzt) und 0,5 bis 1 mg Extraktprotein.

Puffer, EDTA, OAS und Wasser wurden in eine mit Gummistopfen verschließbare Glasküvette pipettiert und für etwa 20 Minuten unter Stickstoff anaerobisiert. Der Extrakt wurde zunächst getrennt von den Ansätzen für etwa 10 Minuten im Eisbad anaerobisiert, dann mittels einer Spritze durch die Gummistopfen in die Ansätze injiziert. Nach weiterem 15- bis 20minütigen Anaerobisieren wurde das elektrochemisch reduzierte Methylviologen mittels einer Injektionsspritze zugefügt und der Ansatz für etwa 5 Minuten im Photometer bei 604 nm äquilibriert bis sich eine konstante Null-Linie einstellte. Die Reaktion wurde durch In-

jektion von 30 µl anaerobisiertem Na_2SO_3 gestartet und die Extinktionsabnahme für 5 bis 10 Minuten verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für MVH bei 604 nm beträgt $1,4 \times 10^4$ (Asada 1967).

5.3.2. Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität

Das Testsystem für die Sulfitreduktase wurde auch für die Nitritreduktase verwendet, um beide Enzyme unter vergleichbaren Bedingungen messen zu können. Der Testansatz mit einem Volumen von 3 ml enthielt komplett: 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7, 2 mg BSA, 0,33 mM Methylviologen, 0,1 mM $NaNO_2$ (frisch angesetzt) und etwa 0,05 bis 0,1 mg Extraktprotein.

Die Behandlung des Ansatzes erfolgte in der beim Sulfitreduktase-Test geschilderten Weise. Die Extinktionsabnahme bei 604 nm wurde für ein bis zwei Minuten gemessen.

5.3.2.1. Nicht-enzymatische Reaktion von Nitrit mit Methylviologen

Bei der Aktivitätsmessung der Nitritreduktase trat spontan eine nicht-enzymatische Reaktion von Nitrit und MVH auf, die durch eine Schwermetallkatalyse hervorgerufen wurde. Diese mit einer lag-Phase beginnende Reaktion ließ sich durch EDTA oder BSA unterbinden (siehe Tab.)

Zusatz	Oxidationsrate des MVH ΔE_{604}/Min. x Ansatz
-	0,0325 (nach lag-Phase von 2 Min.)
10 µM $FeSO_4$	0,375 (ohne Verzögerung)
10 µM $FeSO_4$ + 20 µM EDTA	0
20 µM EDTA	0
10 µM EDTA	0
5 µM EDTA	0,0075 (nach lag-Phase von 20 Min.)
2 µM EDTA	0,0225 (nach lag-Phase von 5 Min.)
2 mg BSA	0 (über 20 Min.)

Einfluß von EDTA und BSA auf die nicht-enzymatische Reaktion von Nitrit mit Methylviologen

Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden; die Ansätze enthielten kein Enzymprotein

5.3.3. Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität

Die Nitratreduktase-Aktivität wurde gemäß den Angaben von Maldonado et al. (1978) gemessen. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 ml enthielt 2,5 bis 3,5 mg Extraktprotein.

Eine Aktivierung der Nitratreduktase durch Inkubation mit Ferricyanid gemäß Pistorius et al. (1976) konnte nicht festgestellt werden.

5.3.4. Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität wurde nach einem in den "Methoden der enzymatischen Analyse" (Bergmeyer 1970) veröffentlichten Test gemessen. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 ml enthielt 0,05 bis 1,0 mg Extraktprotein. Im Falle der NADPH-abhängigen Glu-DH wurde das NADH ersetzt durch 0,5 mM $NADP^+$, 0,5 mM G6P und 1 Einheit G6P-DH (1 Einheit = 1 µMol $NADPH_{gebildet}$/Min.); bei diesem Ansatz ging dem Reaktionsstart eine 20minütige Vorinkubation voraus, um NADPH entstehen zu lassen.

Das im Originalansatz aufgeführte EDTA rief bei der NADH-abhängigen Glu-DH eine 30%ige, bei der NADPH-abhängigen Glu-DH eine 50%ige Aktivitätshemmung hervor; es wurde daher hier nicht eingesetzt.

5.3.5. Bestimmung der GOGAT-Aktivität

Die Aktivität der GOGAT wurde gemäß einem von Miflin und Lea (1975) bzw. Fowler et al. (1974) beschriebenen Testsystem gemessen. Der Ansatz enthielt 0,5 bis 2,0 mg Extraktprotein in 1 ml Gesamtvolumen.

5.3.6. Bestimmung der ATP-Sulfurylase-Aktivität

Die ATP-Sulfurylase-Aktivität wurde mit dem gekoppelten optischen Test (Schwenn et al. 1979) gemessen. Der Ansatz enthielt 0,1 bis 0,4 mg Extraktprotein. Das hier in einer Konzentration von 0,05 mM eingesetzte enzymatisch präparierte APS wurde von Herrn Dr. Schwenn zur Verfügung gestellt.

5.3.7. Bestimmung der Glutamin-Synthetase-Aktivität

Die Aktivitätsmessung der Glutamin-Synthetase wurde nach Shapiro und Stadtman (1970) modifiziert. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 ml enthielt 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7,2, 100 mM Glutamat (frisch angesetzt, neutralisiert), 100 mM Hydroxylamin (frisch angesetzt, neutralisiert), 10 mM ATP (neutralisiert), 20 mM $MgCl_2$, 25 mM MSH und 0,3 bis 2,0 mg Extraktprotein. Die Ansätze wurden für 5 Minuten bei 35°C inkubiert, mit 1,5 ml Fe^{3+}-Reagenz (1 M $FeCl_3$, 12,5 M HCl, 1 M TCA) abgestoppt, 10 Minuten zur Farbkomplexbildung stehengelassen, abzentrifugiert und bei 546 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen.

5.3.8. Bestimmung der O-acetylserin-Sulfhydrylase-Aktivität

Die OASS-Aktivität wurde durch Bestimmung des Cysteins mit Ninhydrin nach Gaitonde (1967) ermittelt. Der Ansatz, modifiziert nach Becker et al. (1969), enthielt 80 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 0,8 mM EDTA, 25 mM OAS (neutralisiert), 10 mM Na_2S (frisch angesetzt) und 0,05 bis 0,2 mg Extraktprotein in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml. Nach 10minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 0,5 ml Eisessig gestoppt und der Cystein-Nachweis durchgeführt.

5.3.9. Bestimmung der (P)APS-reduzierenden Aktivität

Das Testsystem für die (P)APS-reduzierende Aktivität wurde nach einer Methode von Urlaub (Urlaub und Jankowski 1982, im Druck) modifiziert. Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 0,6 ml: 33 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,7, je 6 mM KCl und $MgCl_2$, 1 mM NADP , 10 mM G6P, 1 Einheit G6P-DH (1 Einheit = 1 µMol $NADPH_{gebildet}$/Min.), 33 mM OAS (neutralisiert), 0,5 Einheiten OASS (1 Einheit = 1 µMol $Cys_{gebildet}$/Min.), 0,7 bis 1,5 mg Extraktprotein, 80 µM ^{35}S-markiertes APS (spez. Akt.: etwa

30000 cpm/nmol) oder 80 µM ^{35}S-markiertes PAPS (spez. Akt.: etwa 15000 cpm/nmol); mit APS als Substrat enthielt der Ansatz zusätzlich 1,7 mM GSH.

Zur Bildung von NADPH wurde der Ansatz ohne Extrakt und Substrat vor Zugabe von Ferredoxin und FNR zunächst für 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend für weitere 20 Minuten zur Bildung von reduziertem Ferredoxin. Nach Extraktzugabe wurde 10 Minuten lang anaerobisiert und dann die Reaktion mit APS oder PAPS gestartet. Während der 45minütigen Inkubationszeit blieben die Reaktionsgefäße verschlossen. Zum Abstoppen wurden die Ansätze mit 0,2 ml 2 M HCl versetzt. Je 40 µMole Cystein und DTE dienten als Träger bzw. Austauscher von Protein-adsorbiertem ^{35}S-Cystein. Ausgefälltes Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand auf einen Kationenaustauscher (Dowex 50 WX 8, 0,9 x 8 cm, äquilibriert mit 10 mM HCl, gewaschen mit 1 Säulenvolumen H_2O) aufgetragen. Das nicht umgesetzte ^{35}S-APS bzw. ^{35}S-PAPS wurde mit 4 Säulenvolumina 10 mM HCl abgetrennt und das ^{35}S-markierte Cystein nach Waschen mit 1 Säulenvolumen H_2O mit 3 M NH_4OH am Durchflußzähler eluiert und in Fraktionen von 2 bis 6 ml aufgefangen. Der Cystein-Gehalt der Fraktionen wurde anfänglich mit dem Ninhydrin-Nachweis qualitativ überprüft; Aliquots von 0,5 ml aus den entsprechenden Fraktionen wurden im Szintillationszähler ausgezählt.

Die enzymatisch synthetisierten ^{35}S-markierten Adenylylsulfate stellte Herr Dr. Schwenn zur Verfügung, die aus Spinat präparierte FNR Herr Klein-Hitpaß.

5.3.10. Bestimmung der APS-Sulfotransferase-Aktivität

Die Aktivität der APS-Sulfotransferase wurde nach dem von Schmidt veröffentlichten Testsystem bestimmt (Schmidt 1972). Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,25 ml etwa 0,25 mg Extraktprotein.

5.4. Nachweis von Sulfid im Testansatz für die Sulfitreduktase

Das bei der MVH-abhängigen Sulfitreduktion entstandene Sulfid wurde in Abwandlung der von Siegel (1965) veröffentlichten Methode als Methylenblaukomplex nachgewiesen. Zur Adaption an den Sulfitreduktase-Testansatz mußte das Volumen des Originaltests nach Siegel verdreifacht werden, da aufgrund der geringen Umsatzraten der Sulfitreduktase das gesamte Ansatzvolumen von 3 ml einzusetzen war. Diese Verdreifachung senkte die Empfindlichkeit des Tests von E_{650} = 0,700/50 nMole Sulfid auf 0,250/50 nMole Sulfid (gemessen mit N,N-Dimethyl-p-phenylendiamindichlorid als Nachweisreagenz). Eine Verdreifachung der Konzentration der Nachweisreagenzien DMPD und $FeCl_3$ brachte keine Verbesserung. Darüberhinaus wurde die Empfindlichkeit durch Bestandteile des Sulfitreduktase-Ansatzes (Puffer, Protein) noch weiter auf E_{650} = 0,150/50 nMole Sulfid gesenkt. Zusätze wie FAD und FMN führten zur Bildung eines Niederschlages .

Aus diesem Grunde schien es vorteilhafter, das entstandene Sulfid durch Destillation von den übrigen Bestandteilen des Ansatzes abzutrennen. Hierzu wurde der gesamte Sulfitreduktase-Ansatz nach Abstoppen der Reaktion durch Luftzufuhr (Oxidation des MVH) in ein Szintillationsgläschen gebracht, ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,2 ml ZnAc-Lösung hineingestellt und zur Austreibung des Sulfids 0,5 ml 12 N Schwefelsäure auf den Sulfitreduktase-Ansatz neben das Eppendorfgefäß pipettiert. Das Szintillationsgefäß wurde sofort verschlossen und für mindestens 6 Stunden im Schüttelinkubator bei 40°C belassen. Anschließend wurde das ZnAc mit destilliertem Wasser auf 0,8 ml verdünnt und der Test nach Siegel in seiner Originalform angewendet.

Die Absorptionskapazität des ZnAc stieg mit seiner Konzentration; andererseits senkte stark konzentriertes ZnAc die Empfindlichkeit des Sulfidnachweises. Aus diesem Grunde wurde als Kompromiß eine ZnAc-Konzentration von 0,175 M gewählt. Der pH-Wert des ZnAc (eingestellt mit Eisessig) wirkte sich ebenfalls auf die Absorptionskapazität aus; bei pH 4 war die Empfindlichkeit um 25% höher als bei pH 5. Bei einer ZnAc-Konzentration von 0,175 M und pH 4 ergaben 50 nMole Sulfid eine Extinktion von

etwa 0,190. Dieses System wurde nur durch Sulfit beeinflußt, was sich in einer Farbverschiebung von Blaugrün nach Violett äußerte, jedoch durch Extinktionsmessung gegen einen Nullwert ohne Bedeutung war. Die Nachweisgrenze lag bei 10 nMolen Sulfid im Sulfitreduktase-Ansatz.

Der Nachweis des Sulfids mit DTNB (Nashef et al. 1977) wird sehr stark durch Sulfit beeinträchtigt, so daß sich diese Methode als unzweckmäßig herausstellte.

5.5. Nachweis von Cystein im Testansatz für die Sulfitreduktase

Zum Nachweis von Cystein im Sulfitreduktase-Ansatz wurde die Methode nach Gaitonde (1967) in Abwandlung verwendet. Dem Sulfitreduktase-Ansatz wurde nach Abstoppen durch Luftzufuhr ein Aliquot von 1,2 ml entnommen, je 1 ml Eisessig und Ninhydrinlösung zugegeben, 10 Minuten bei 80°C erhitzt und nach kurzem Abkühlen im Photometer bei 560 nm gegen einen Leerwert gemessen. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit unterblieb in diesem Falle die Verdünnung mit konzentriertem Äthanol. Die Ansätze mußten dann ohne längeren Verzug nach dem Erhitzen gemessen werden, da der Farbkomplex rascher zerfiel. Die Nachweisgrenze lag im Bereich von 5 bis 10 nMolen Cystein im Sulfitreduktase-Ansatz.

5.6. Nachweis von Nitrit im Testansatz für die Nitritreduktase

Der Verbrauch an Nitrit bei der MVH-abhängigen Nitritreduktion wurde ermittelt durch Bestimmung des Nitritrestgehalts als Azofarbkomplex (Jander und Blasius (eds.) 1970). Nach Abstoppen der Reduktionsreaktion durch Luftzufuhr wurde der Ansatz mit je 2,5 ml Sulfanilessigsäure (0,33 g Sulfanilsäure gelöst in 75 ml warmem Wasser, versetzt mit 25 ml Eisessig) und α-Naphthylaminessigsäure (0,1 g α-Naphthylamin gelöst in 20 ml kochendem Wasser, filtriert, versetzt mit 25 ml Eisessig, aufgefüllt mit Wasser auf 100 ml) gemischt und nach 10 Minuten bei 546 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Nachweisgrenze lag bei 10 bis 20 nMolen NO_2^-.

5.7.1. Gelchromatographie von partiell gereinigtem Enzymextrakt über Sephacryl S 200

Aufschluß des Gewebes (etwa 55 g) und Fällung mit Ammoniumsulfat erfolgten gemäß der Präparation des partiell gereinigten Enzymextraktes. Nach Resuspension des Pellets der Ammoniumsulfat-Fällung wurde für 10 Minuten bei 48000 x g zentrifugiert und der klare Überstand (4 ml) zur Gelchromatographie über Sephacryl S 200 (2 x 22 cm) gegeben. Zur Elution wurde 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7 verwendet.

5.7.2. Ionenaustauschchromatographie von partiell gereinigtem Enzymextrakt über Sephacel

Im Anschluß an die Gelchromatographie über Sephacryl S 200 (s.o.) wurden die im Bereich von 50 bis 100 kdalton gesammelten Fraktionen mit destilliertem Wasser 1:2 verdünnt und auf einen Ionenaustauscher (Sephacel, 1,4 x 7 cm) aufgetragen. Die Stufenelution erfolgte mit 100, 200 und 300 mM NaCl in 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,7. Die Enzymverteilung von Sulfitreduktase, Nitritreduktase und OASS ergab sich wie folgt:

	SIR	NIR	OASS
1. Stufe (100 mM NaCl)	53%	0%	71%
2. Stufe (200 mM NaCl)	21%	95%	29%
3. Stufe (300 mM NaCl)	26%	5%	0%

(die Summe der Aktivitäten in den einzelnen Stufen wurde gleich 100% gesetzt).

5.8. Reinigung der OASS aus Catharanthus-Kulturen

Etwa 300 g Gewebe von 4 Tage alten S-heterotroph im Licht gezogenen Catharanthus-Kulturen wurde nach dem Abnutschen und Waschen mit 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 zusammen mit 300 ml Aufarbeitungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 0,5 mM EDTA + 10 mM MSH + 1 mM $Na_2S_2O_5$) und 70 g Glasperlen für 30 Sekunden im Waring blender auf höchster Stufe homogenisiert. Es folgten Zentrifugation des Homogenats für 15 Minuten bei 17000 x g, Ammoniumsulfat-Fällung von 0 bis 40% (+ 1 mM EDTA bei pH 7,0), Zentrifugation für 5 Minuten bei 6000 x g und Resuspension des Pellets in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5. Nach Chromatographie über Sephacryl S 200 (2,8 x 54 cm) wurden die aktivsten Fraktionen einer Ionenaustausch-Chromatographie unterzogen (Sephacel, 1,6 x 10 cm) mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 300 mM in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5. Die aktivsten Fraktionen wurden gefällt (0 bis 80% Ammoniumsulfat + 1 mM EDTA) und das resuspendierte Protein über Sepharose 6B (1,6 x 30 cm) chromatographiert. Die vereinigten Fraktionen besaßen eine spezifische Aktivität von 6,94 µMolen Cys/Min. x mg Protein. Die OASS konnte ohne nennenswerten Aktivitätsverlust bei -20°C eingefroren werden.

5.9. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Bradford (1976).

5.10. Sulfatbestimmung

Die Bestimmung des Sulfatgehaltes im Nährmedium der Zellkulturen wurde gemäß der von Rennenberg und Bergmann (1979) beschriebenen Methode durchgeführt.

5.11. Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration im Gewebe der Catharanthus-Kulturen erfolgte nach der Methode von Arnon (1949).

5.12. Trockengewichtsbestimmung

Das gewaschene, abgenutschte Zellgewebe wurde zur Bestimmung des Trockengewichtes in Kolben eingewogen und das Gewebegewicht nach Gefriertrocknung erneut bestimmt.

6. Literaturhinweise

Abrams,W.R.,Schiff,J.A.:
Arch.Mikrobiol. 94 (1973) 1-10

Aketagawa,J.,Tamura,G.:
Agr.Biol.Chem. 44 (1980) 2371-2378

Aparicio,P.J.,Knaff,D.B.,Malkin,R.:
Arch.Biochem.Biophys. 169 (1975) 102-107

Arnon,D.I.:
Plant Physiol. 24 (1949) 1-15

Asada,K.:
J.Biol.Chem. 242 (1967) 3646-3654

Asada,K.,Tamura,G.,Bandurski,R.S.:
J.Biol.Chem. 244 (1969) 4904-4915

Becker,M.A.,Kredich,N.M.,Tomkins,G.M.:
J.Biol.Chem. 244 (1969) 2418-2427

Bergmeyer,H.Cl. (ed.):
Methoden der enzymatischen Analyse Bd.I
S. 420/421, Verlag Chemie,Weinheim 1970

Betts,G.F.,Hewitt,E.J.:
Nature 210 (1966) 1327

Bone,D.H.:
Nature 184 (1959) 990

Bradford,M.M.:
Analyt.Biochem. 72 (1976) 248-254

Brenchley,J.E.:
J.Bacteriol. 114 (1973) 666-673

Brunold,C.,Schmidt,A.:
Plant Physiol. 61 (1978) 342-347

Brunold,C.,Zrÿd,J.-P.,Lavanchy,P.:
Plant Sci.Lett. 21 (1981) 167-174

Cárdenas,J.,Barea,J.L.,Rivas,J.,Moreno,C.G.:
FEBS Lett. 23 (1972) 131-135

Cherest,H.,Surdin-Kerjan,Y.,Antoniewski,J.,
De Robichon-Szulmajster,H.:
J.Bacteriol. 114 (1973) 928-933

Chroboczek Kelker,H.,Filner,P.:
Biochim.Biophys.Acta 252 (1971) 69-82

Collins,J.M.,Wallenstein,A.,Monty,K.J.:
Biochim.Biophys.Acta 313 (1973) 156-162

Doelle,H.W.:
Bacterial Metabolism, 2nd edition, 339-354
Academic Press New York 1975

Dreyfuss,J.,Monty,K.J.:
J.Biol.Chem. 238 (1963) 3781-3783

Ellis,R.J.,Humphries,S.K.,Pasternak,C.A.:
Biochem.J. 92 (1964) 167-172

Ellis,R.J.:
Planta 88 (1969) 34-42

Filner,P.:
Biochim.Biophys.Acta 118 (1966) 299-310

Fowler,M.W.,Jessup,W.,Sarkissian,G.S.:
FEBS Lett. 46 (1974) 340-342

Fromageot,P.,Perez-Milan,H.:
Biochim.Biophys.Acta 32 (1959) 457-464

Gaitonde,M.K.:
Biochem.J. 104 (1967) 627-633

Harrington,H.M.,Smith,I.K.:
Plant Physiol. 65 (1980) 151-155

Hennies,H.-H.:
Dissertation Bochum (1974)

Hewitt,E.J.,James,D.M.,Eaglesham,A.R.J.:
Molec.Cell.Biochem. 6 (1975) 101-105

Hirasawa,M.,Tamura,G.:
Agr.Biol.Chem. 43 (1979) 659-661

Hirasawa,M.,Tamura,G.:
Agr.Biol.Chem. 44 (1980) 749-758

Hock Ng,B.,Anderson,J.W.:
Phytochem. 18 (1979) 573-580

Hucklesby,D.P.,Hewitt,E.J.:
Biochem.J. 119 (1970) 615-627

Hucklesby,D.P.,James,D.M.,Banwell,M.J.,Hewitt,E.J.:
Phytochem. 15 (1976) 599-603

Ida,S.,Mori,E.,Morita,Y.:
Planta 121 (1974) 213-224

Jander,G.,Blasius,E.(eds.):
Lehrbuch der analytischen und präparativen Chemie,S.183
Hirzel Verlag 1970

Jenni,B.E.,Brunold,C.,Zrÿd,J.-P.,Lavanchy,P.:
Planta 150 (1980) 140-143

Jones-Mortimer,M.C.,Wheldrake,J.F.,Pasternak,C.A.:
Biochem.J. 107 (1968) 51-53

Kanamori,T.,Konishi,S.,Takahashi,E.:
Physiol.Plant. 26 (1972) 1-6

Kawashima,N.,Asahi,T.:
J.Biochem. 49 (1961) 52-54

Kemp,J.D.,Atkinson,D.E.,Ehret,A.,Lazzarini,R.A.:
J.Biol.Chem. 238 (1963) 3466-3471

Kemp,J.D.,Atkinson,D.E.:
J.Bacteriol. 92 (1966) 628-634

Kredich,N.M.:
J.Biol.Chem. 246 (1971) 3474-3484

Kredich,N.M.,Foote,L.J.,Keenau,B.S.:
J.Biol.Chem. 248 (1973) 6187-6196

Leech,R.M.,Kirk,P.R.:
Biochem.Biophys.Res.Commun. 32 (1968) 685-690

Linsmeier,E.M.,Skoog,F.:
Physiol.Plant. 18 (1965) 100-127

Maldonado,J.M.,Notton,B.A.,Hewitt,E.J.:
FEBS Lett. 93 (1978) 169-173

Miflin,B.J.,Lea,P.J.:
Biochem.J. 149 (1975) 403-409

Murphy,M.J.,Siegel,L.M.,Tove,S.R.,Kamin,H.:
Proc.Natl.Acad.Sci 71 (1974) 612-616

Nashef,A.S.,Osuga,D.T.,Feeney,R.E.:
Analyt.Biochem. 79 (1977) 394-405

Paszewski,A.,Grabski,J.:
Molec.Gen.Genet. 132 (1974) 307-320

Pistorius,E.K.,Gerwitz,H.-S.,Voss,H.,Vennesland,B.:
Planta 128 (1976) 73-80

Ramirez,J.M.,Del Campo,F.F.,Paneque,A.,Losada,M.:
Biochim.Biophys.Acta 118 (1966) 58

Ratajczak,L.,Ratajczak,W.,Mazurowa,H.:
Physiol.Plant. 51 (1981) 277-280

Rennenberg,H.,Bergmann,L.:
Z.Pflanzenphys. 92 (1979) 133-142

Reuveny,Z.,Filner,P.:
J.Biol.Chem. 252 (1977) 1858-1864

Rhodes,D.,Rendon,G.A.,Stewart,G.R.:
Planta 129 (1976) 203-210

Ritenour,G.L.,Joy,K.W.,Bünning,J.,Hageman,R.H.:
Plant Physiol. 42 (1967) 233-237

Rueger,D.C.,Siegel,L.M.:
in: Singer,T.P.(ed.), Flavins and Flavoproteins, Elsevier Scientific Publishing Company 1976

Sawhney,S.K.,Nicholas,D.J.D.:
Plant Sci.Lett. 6 (1976) 103-110

Schiff,J.A.,Hodson,R.C.:
Ann.Rev.Plant Physiol. 24 (1973) 381-413

Schmidt,A.:
Arch.Mikrobiol. 84 (1972) 77-86

Schmidt,A.,Schwenn,J.-D.:
in: Forti,G.,Avron,M.,Melandri,A.(eds.), Proc. 2nd Int.Congr.Photosyn.Res. 1971,S.507-514, W.Junk Publ. The Hague 1972

Schmidt,A.:
Arch.Mikrobiol. 93 (1973) 29-52

Schmidt,A.,Abrams,W.R.,Schiff,J.A.:
Eur.J.Biochem. 47 (1974) 423-434

Schmidt,A.:
Planta 130 (1976) 257-263

Schürmann,P.,Brunold,C.:
Z.Pflanzenphys. 100 (1980) 257-268

Schwenn,J.-D.:
Dissertation Bochum (1970)

Schwenn,J.-D.,Trebst,A.:

in: The Intact Chloroplast, Barber,J.(ed.), S.315-334 Elsevier 1976

Schwenn,J.-D.,Depka,B.,Hennies,H.-H.:

Plant&Cell Physiol. 17 (1976) 165-176

Schwenn,J.-D.,El-Shagi,H.,Kemena,A.,Petrak,E.:

Planta 144 (1979) 419-425

Shapiro,B.M.,Stadtman,E.R.:

in:S.P.Colowick,N.O.Kaplan (eds.),Methods in Enzymology Vol.XVII A,S.914-915, Academic Press 1970

Shepard,D.V.,Thurman,D.A.:

Phytochem. 12 (1973) 1937-1946

Siegel,L.M.:

Analyt.Biochem. 11 (1965) 126-132

Siegel,L.M.,Murphy,M.J.,Kamin,H.:

J.Biol.Chem. 248 (1973) 251-264

Smith,I.K.:

Plant Physiol. 66 (1980) 877-883

Stewart,G.R.:

J.Exper.Botany 23 (1972) 171-183

Tamura,G.:

J.Biochem. 57 (1965) 207-214

Tamura,G.,Asada,K.,Bandurski,R.S.:

Plant Physiol. 42 (1967) S-36

Tamura,G.,Iwasawa,T.,Masada,M.,Fukushima,K.:

Agr.Biol.Chem. 40 (1976) 637-638

Tamura,G.,Hosoi,T.,Aketagawa,J.:

Agr.Biol.Chem. 42 (1978) 2165-2167

Tamura,G.,Hosoi,T.:

Agr.Biol.Chem. 43 (1979) 1601-1602

Tsang,M.L.-S.,Schiff,J.A.:
Plant Sci.Lett. 4 (1975) 301-307

Tsang,M.L.-S.,Schiff,J.A.:
J.Bacteriol. 125 (1976b) 923-933

Tsang,M.L.-S.,Schiff,J.A.:
Eur.J.Biochem. 65 (1976c) 113-121

Tweedie,J.W.,Segel,I.H.:
J.Biol.Chem. 246 (1971) 2438-2446

Vega,J.M.,Kamin,H.:
J.Biol.Chem. 252 (1977) 896-909

Wheldrake,J.F.,Pasternak,C.A.:
Biochem.J. 96 (1965) 276-280

Wheldrake,J.F.:
Biochem.J. 105 (1967) 697-699

Yoshimoto,A.,Sato,R.:
Biochim.Biophys.Acta 153 (1968) 555-575

Zumft,W.G.:
Biochim.Biophys.Acta 276 (1972) 363-375

Herrn Professor Dr. A. Trebst danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeiten, die mir bei der Anfertigung der Dissertation zur Verfügung standen.

Herrn Dr. J.-D. Schwenn gebührt mein Dank für die Betreuung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 19. November 1954 wurde ich als Tochter der Eheleute Hanna und Werner Kemena in Werste Kr. Minden geboren.

Nach Abschluß der vierten Klasse der Volksschule besuchte ich von 1965 bis 1967 das Städtische Neusprachliche Mädchen-Gymnasium in Bad Oeynhausen und von 1967 bis 1973 das Caroline-von-Humboldt-Gymnasium in Minden. Dort legte ich im Mai 1973 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich an der Ruhr-Universität in Bochum mit dem Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien. Das 1. Staatsexamen legte ich im April 1978 ab.

Seit Juli 1978 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Ruhr-Universität.

DER DRUCKER - Buscheystraße 138 - 4630 Bochum - Tel. (02 34) 70 41 16